



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**Prevalência de *Mycoplasma bovis* em 3 OPP Portuguesas:
estudo sero-epidemiológico**

João Manuel Canelas Rasquilho Raposo

Constituição do Júri:

Presidente: Doutor Virgílio Almeida

Vogal: Doutora Yolanda Vaz

Orientadora:

Doutora Cristina Lobo Vilela

2009

LISBOA



Bayer HealthCare
Saúde Animal

Bayer Portugal S.A., Divisão de Saúde Animal



Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA)



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**Prevalência de *Mycoplasma bovis* em 3 OPP Portuguesas:
estudo sero-epidemiológico**

João Manuel Canelas Rasquilho Raposo

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri:

Presidente: Doutor Virgílio Almeida

Vogal: Doutora Yolanda Vaz

Orientadora:

Doutora Cristina Lobo Vilela

2009

LISBOA

“Há países em que o escritor só tem o direito de publicar as suas obras quando elas tenham atingido um alto grau de perfeição artística. Quem se não sinta possuidor de cultura ou das qualidades suficientes só tem uma resolução a tomar: a de dar descanso à sua pena até que aumente a cultura ou as qualidades se afirmem; e, se tal não acontecer, deve naturalmente desistir de continuar pelo caminho empreendido; pode-o fazer sem remorsos; a sua gota de água nenhuma falta fará ao forte rio intelectual da sua pátria. Outras terras existem, porém, em que o valor não está na altura que se atinge, mas no rumo que se seguiu; por condições especiais, a vida de inteligência é sempre nessas nações quase infrutífera e sobretudo perigosa; não se podendo dar exemplo de altos voos, a escolha e a atitude ficarão, por mais pequeno que seja o esforço, por mais humilde que se apresente o resultado, como prova e modelo de tenacidade, de sacrifício e de coragem civil; por esta estrada, se por alguma, se redimirá um dia a nação de todos os pecados; cumpre aos melhores mostrar-lha desde já. (...) Um dia a obra será classificada como inferior, mas só por ela será possível esta sentença dos juízes; se o que se escreveu pode ser considerado mau já o mesmo se não se dirá do acto de escrever; eis a base em que se firmaram as escadas que vão até ao céu, eis o ideal alicerce dos templos perfeitos; não os erguemos nós próprios, mas que importa?” (Agostinho da Silva, 1990, p.29, Diário de Alcestes. Lisboa: Ulmeiro).

À minha Família e aos que têm iluminado o meu caminho.

Agradecimentos

Quando leio agradecimentos em qualquer obra, seja ela de que índole for, pergunto-me frequentemente sobre a relevância dos mesmos e sobre a necessidade de por vezes serem tão extensos. Compreendo hoje, a sua razão de ser.

A presente dissertação não seria possível sem a colaboração e apoio de um conjunto de instituições e pessoas às quais qualquer agradecimento me soará necessariamente curto e insuficiente, pela importância individual de cada um no todo.

Começo por referir o apoio institucional da Bayer Saúde Animal, através do financiamento para a compra dos testes comerciais de ELISA; bem como do CIISA , que disponibilizou os seus recursos para a realização do trabalho laboratorial.

Sem qualquer outra ordem de importância que não a cronológica, porque tal seria da minha parte injusto, um Muito Obrigado às pessoas que fazem parte deste trabalho e deste meu passo:

Professora Cristina Vilela, por ter estado presente no início, no meio e no fim, com a sua inigualável capacidade de objectivar, concretizar e “mostrar o caminho”;

Dr. Dargent de Figueiredo, pelos conselhos e exemplo;

Carla Carneiro, pela interminável ajuda na realização dos testes de ELISA;

Filipa Dias, pela disponibilidade, boa disposição e ajuda na realização dos testes de ELISA;

Dra. Ana Rita Simões (OPP de Campo Branco), pela amizade, dedicação e apoio na cedência de listagens de efectivos, recolha de amostras e realização de inquéritos epidemiológicos;

Dr. Ventura (OPP de Vila do Conde), Dr. Valente e Dr. Fernando Monteiro (OPP de Acripinhal) pela dedicação e apoio na cedência de listagens de efectivos, recolha de amostras e realização de inquéritos epidemiológicos;

Dr. Ricardo Bexiga, pelo companheirismo e apoio ao longo do tempo;

Dra. Ana Vieira (Rafael e Filho), pela amizade e possibilidade e colaboração no estudo de caso de bovinos de engorda;

Dr. Luís Pinho, pela possibilidade e colaboração no estudo de caso de bovinos de leite;

Doutora Solange Gil, pela amizade, ensinamentos, disponibilidade e ajuda na montagem do procedimento experimental do teste comercial de ELISA;

Doutora Manuela Oliveira, pela amizade e presença e incentivo;

Dr. Hugo Palma, pela amizade e colaboração na recolha de amostras individuais debaixo de sol e chuva;

Dra. Catarina Afonso e Dr. Peladinho Costa, colaboração na recolha de amostras individuais;

Professor Doutor Niza Ribeiro e Dra. Madalena Lima (Segalab), pela disponibilidade e colaboração na centralização de amostras e congelação de soros;

Dr. Assis Vieira (Laboratório Veterinário do Litoral Alentejano), pela colaboração na centralização de amostras e congelação de soros;

Professora Doutora Isabel Neto, pelo apoio e ajuda preciosa na análise estatística;

Shital Ranchordas pela presença e motivação;

Dra. Filipa Baptista, pelo apoio na análise estatística;

Ana Raposo, pela ajuda e partilha de fins-de-semana “sofridos”;

Aos pais, avós e amigos por compreenderem a ausência.

Aos que não referi e que fazem parte do projecto...

Prevalência de *Mycoplasma bovis* em 3 OPP Portuguesas: estudo sero-epidemiológico

Resumo

Mycoplasma bovis é um agente patogénico envolvido no complexo respiratório bovino, em mastites, queratoconjuntivites, otites, artrites e infertilidade em bovinos. Tem distribuição mundial, e na Europa é responsável por 25% a 33% das pneumonias em bovinos. No presente estudo foram seleccionadas para recolha de amostras sanguíneas 3 Organizações de Produtores Pecuários (OPP) de áreas geográficas de Portugal Continental com características de exploração distintas: OPP de Vila do Conde (Norte), OPP de Acripinhal (Centro) e OPP do Campo Branco (Sul). A unidade epidemiológica considerada foi a exploração de bovinos, pretendendo-se determinar, por ELISA, a prevalência de explorações com animais seropositivos para *M. bovis* nas OPP, bem como a prevalência intra-exploração destes animais. Foram amostradas 61 explorações em Vila do Conde, 59 explorações no Campo Branco e 3 explorações em Acripinhal, num total de 123 explorações e de 1519 animais. Os resultados, expressos semi-quantitativamente, demonstraram a presença de anticorpos contra *M. bovis* em 98% das explorações testadas (n=121). Na prevalência intra-exploração foi encontrada uma mediana de animais positivos por exploração de 50% na OPP de Vila do Conde, 85% na OPP de Acripinhal e de 73% na OPP do Campo Branco. Os resultados revelam uma elevada exposição dos bovinos em estudo a *M. bovis*. Adicionalmente, como forma de complementar a investigação realizada nas OPP, foram efectuados 2 estudos de caso: um numa exploração de engorda e outro numa exploração leiteira. Na exploração de engorda foi encontrada elevada prevalência de anticorpos anti-*M. bovis* (98%), não tendo sido verificadas diferenças significativas na seroconversão ao fim de 30 dias. Na exploração de leite foi encontrada uma elevada prevalência de anticorpos anti-*M. bovis* (98%), compatível com o isolamento do agente por métodos microbiológicos e moleculares bem como com a sintomatologia clínica evidenciada pelos animais, tendo sido observada uma relação entre o grau de positividade do teste comercial de ELISA e o isolamento do agente. O elevado contacto com *Mycoplasma bovis* nas explorações portuguesas, revelado pela elevada prevalência de anticorpos encontrada nos estudos realizados poderá ter consequências negativas tanto a nível de saúde e bem-estar animal, como de rendimento económico das explorações nacionais.

Palavras-chave: *Mycoplasma bovis*, serologia, prevalência, epidemiologia, Portugal

***Mycoplasma bovis* prevalence in 3 Portuguese OPPs: sero-epidemiologic study**

Abstract

Mycoplasma bovis is a pathogen frequently involved in the bovine respiratory complex, mastitis, keratoconjunctivitis, arthritis and infertility. It has a worldwide distribution and, in Europe, is responsible for one third to one quarter of bovine pneumonia cases. The present study was conducted in 3 Farmers' Associations (Organização de Produtores Pecuários, OPP): Vila do Conde (North), Acripinhal (Center) and Campo Branco (South). The epidemiologic unit considered was the farm, aiming at determining, through an ELISA test, the prevalence of herds with seropositive animals, as well the seropositive animals' prevalence within each herd. A total of 123 farms, comprising 1519 animals, were sampled: 61 farms in Vila do Conde, 3 in Acripinhal and 59 in Campo Branco. The results, expressed semi-quantitatively, showed anti-*Mycoplasma bovis* antibodies present in 98% of the tested herds (n=121). Concerning the prevalence within each herd, a median of 50% positive animals was found in the OPP of Vila do Conde, 85% in the OPP of Acripinhal and 73% in the OPP of Campo Branco. Additionally, two case-studies were performed to complement the main study in the 3 OPPs: one in a feedlot and another in a dairy farm. In the feedlot, a high prevalence of seropositive animals was found as well (98%) and no significant differences were found in the seroconversion after 30 days. In the dairy farm, a high prevalence of seropositive animals was found (98%), which is compatible with the results obtained by microbiology and PCR techniques, as well as with the clinical history from the farm. In the same case study, an association between the degree of antibodies and the identification of the bacteria was found. These results reveal a high exposure of the animals comprised in these studies to *Mycoplasma bovis*, which will most likely carry negative consequences to animal health and welfare, as well as to the economic performance of the farms.

Key words: *Mycoplasma bovis*, serology, prevalence, epidemiology, Portugal

Comunicações apresentadas no âmbito da dissertação

Raposo, J.C., Gil, S., Carneiro, C., Oliveira, M., Figueiredo, M.D. & Vilela, C. (2008). Micoplasmose bovina na OPP de Vila do Conde: estudo sero-epidemiológico [abstract], *Livro de resumos do IV Congresso da Sociedade de Ciências Veterinárias, INRB INIA / Fonte Boa, Santarém, 27-29 de Novembro*, pp. 101. Lisboa, Portugal: Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias.

Raposo, J.C., Carneiro, C., Ventura, A., Simões, A. R., Figueiredo, M.D. & Vilela, C. (2009). Prevalência serológica de *Mycoplasma bovis* em 3 OPP Portuguesas [abstract], *Cd de comunicações das XIII Jornadas da Associação Portuguesa de Buiatria, Póvoa de Varzim, 24-26 de Abril*, comunicação livre nº 7.

Raposo, J.C., Carneiro & C., Vieira A. (2009). *Mycoplasma bovis*: perfil de seroconversão em bovinos de engorda. *Comunicação em painel nas XIII Jornadas da Associação Portuguesa de Buiatria, Póvoa de Varzim, 24-26 de Abril*, poster nº3.

Publicações

Raposo, J.C., Figueiredo, M.D. & Vilela, C. (2009). *Mycoplasma bovis*: sim ou não?. *A Vaca Leiteira*, Revista da Associação Portuguesa dos Criadores de Raça Frísia, Samora Correia, 107, Abril/Junho, pp.48-52.

Índice Geral

1) INTRODUÇÃO	1
1.1) ASPECTOS HISTÓRICOS	2
1.2) TAXONOMIA.....	3
1.3) CARACTERÍSTICAS DE <i>MYCOPLASMA BOVIS</i>	4
1.3.1) <i>Características culturais</i>	4
1.3.2) <i>Características genómicas</i>	6
1.4) EPIDEMIOLOGIA	6
1.5) PATOFISIOLOGIA.....	11
1.6) IMPACTO ECONÓMICO	14
1.7) DIAGNÓSTICO.....	14
1.7.1) <i>Métodos culturais</i>	14
1.7.2) <i>Métodos serológicos</i>	15
1.7.3) <i>Métodos de biologia molecular</i>	17
1.8) TERAPÊUTICA.....	18
1.9) ABORDAGENS DE CONTROLO.....	20
2) PREVALÊNCIA DE <i>MYCOPLASMA BOVIS</i> EM 3 OPP PORTUGUESAS: ESTUDO SERO-EPIDEMIOLÓGICO	24
2.1) INTRODUÇÃO.....	24
2.2) MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.2.1) <i>Área e população em estudo</i>	26
2.2.2) <i>Amostragem de explorações</i>	27
2.2.3) <i>Amostragem intra - exploração</i>	28
2.2.4) <i>Elaboração de questionários de exploração</i>	28
2.2.5) <i>Recolha de amostras</i>	28
2.2.6) <i>Processamento de amostras</i>	29
2.2.6.1) <i>Fundamentos do teste de ELISA</i>	29
2.2.6.2) <i>Procedimento experimental</i>	30
2.2.6.3) <i>Cálculo dos resultados</i>	31
2.2.7) <i>Análise dos resultados</i>	32
2.3) RESULTADOS	32
2.3.1) <i>Caracterização das explorações em estudo</i>	32
2.3.2) <i>Número de amostras individuais recolhidas por exploração</i>	33
2.3.3) <i>Resultados dos testes de ELISA</i>	34
2.3.3.1) <i>Prevalência de explorações positivas a anticorpos anti-<i>Mycoplasma bovis</i></i>	34
2.3.3.2) <i>Prevalência Intra-Exploração de anticorpos anti-<i>Mycoplasma bovis</i></i>	35
2.3.4) <i>Resultados dos inquéritos epidemiológicos</i>	38
2.4) DISCUSSÃO	41
3) ESTUDOS DE CASO	52
3.1) EXPLORAÇÃO DE ENGORDA.....	52
3.1.1) <i>Introdução</i>	52
3.1.2) <i>Materiais e métodos</i>	52
3.1.3) <i>Resultados</i>	53
3.1.4) <i>Discussão</i>	54
3.2) EXPLORAÇÃO LEITEIRA	56
3.2.1) <i>Introdução</i>	56
3.2.2) <i>Materiais e métodos</i>	57
3.2.3) <i>Resultados</i>	58
3.2.4) <i>Discussão</i>	60
4) CONCLUSÕES GERAIS	62
5) BIBLIOGRAFIA.....	66
6) ANEXOS	81
Anexo 1. <i>Questionário epidemiológico</i>	81

Anexo 2. Resultados dos testes de ELISA na OPP de Vila do Conde, OPP de Acripinhal e OPP de Campo Branco.	83
Anexo 3. Análise estatística	86

Índice de figuras, tabelas e gráficos

Índice de figuras

Figura 1. Tubos de plástico estéreis, utilizados na recolha de amostras sanguíneas individuais.	29
Figura 2. Bio-X <i>Mycoplasma bovis</i> Elisa Kit: Bio K 260.	30
Figura 3. Distribuição de conjugado em cada poço, recorrendo a pipeta multicanal.	31

Índice de tabelas

Tabela 1. Espécies de <i>Mycoplasma</i> com importância veterinária	4
Tabela 2. Propriedades bioquímicas comparativas de micoplasmas bovinos.....	5
Tabela 3. Amostras adequadas para diagnóstico de doenças causadas por <i>M. bovis</i>	14
Tabela 4. Eficácia dos antibióticos <i>in vitro</i> contra estirpes de campo de <i>M. bovis</i>	19
Tabela 5. Eficácia dos antibióticos <i>in vitro</i> contra estirpes de campo de <i>M. bovis</i> isolados em França.....	19
Tabela 6. Efectivos bovinos em Portugal em 2007	26
Tabela 7. Análise estatística descritiva do número de bovinos por exploração amostrada, agrupados pelas OPP de origem.	33
Tabela 8. Análise estatística descritiva do número de bovinos com recolha de sangue individual por exploração amostrada, agrupados pelas OPP de origem.	34
Tabela 9. Prevalência de Explorações positivas na OPP de Vila do Conde, Acripinhal e Campo Branco.....	35
Tabela 10. Resultados semi-quantitativos dos testes individuais por exploração, na OPP de Vila do Conde.	35
Tabela 11. Resultados percentuais, por exploração, na OPP de Vila do Conde.	35
Tabela 12. Resultados semi-quantitativos dos testes individuais por exploração, na OPP de Acripinhal.	36
Tabela 13. Resultados percentuais, por exploração, na OPP de Acripinhal.	36
Tabela 14. Resultados semi-quantitativos dos testes individuais por exploração, na OPP de Campo Branco.....	37
Tabela 15. Resultados percentuais, por exploração, na OPP de Campo Branco.	37
Tabela 16. Tipo e regime das explorações inquiridas, por OPP.....	38
Tabela 17. Existência de contacto com bovinos de outras explorações, por OPP.....	39
Tabela 18. Existência de contacto com outras espécies pecuárias na exploração, por OPP.....	39

Tabela 19. Reposição de animais realizada com animais nascidos na exploração, por OPP.	40
Tabela 20. Explorações que compram animais, por OPP.	40
Tabela 21. Local de compra de animais, por OPP.	40
Tabela 22. Vacinação em cada exploração, por OPP.	41
Tabela 23. Resultados semi-quantitativos dos testes individuais em número absoluto e em percentagem.	58
Tabela 24. Resultados semi-quantitativos dos testes individuais das vacas positivas a <i>Mycoplasma bovis</i> no leite através de microbiologia, bioquímica e PCR.	59

Índice de gráficos

Gráfico 1. Mediana de animais positivos por exploração, em percentagem, nas 3 OPP.	38
Gráfico 2. Resultados semi-quantitativos dos testes individuais em número absoluto no dia 1 do estudo.	53
Gráfico 3. Resultados semi-quantitativos dos testes individuais em número absoluto no dia 30 do estudo.	54
Gráfico 4. Variação do grau de positividade entre os dois momentos, traduzidos pela diferença de grau entre o dia 1 e o dia 30.	54

Lista de abreviaturas e símbolos

BSE - *Encefalopatia Espongiforme Bovina*
BRSV - Vírus respiratório sincial bovino
BVDV - Vírus da diarreia viral bovina
CIM - Concentração Inibitória Mínima
DNA - Ácido desoxiribonucleico
DO - Densidades ópticas
DRB - *Doença Respiratória Bovina*
EDM - Entre-Douro e Minho
ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
E.U.A. - Estados Unidos da América
FMV-UTL - Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa
IBRV - Vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina
IC - Intervalo de confiança
ICBAS - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
INE - Instituto Nacional de Estatística
K- factor kappa
L - Erro absoluto
LC - Colónia grande
M - Molar
ml - Mililitro
n - Número
Nm - Nanómetro
NUTS II - Nomenclatura comum das unidades territoriais estatísticas
OPP - Organizações de Produtores Pecuários
p - Valor p
P - Prevalência
PCR - Reacção em cadeia da enzima polimerase
PI3V - Vírus parainfluenza 3
PISA - Programa informático de sanidade animal
QC - Controlo de Qualidade
SC - Colónia pequena
SNIRB - Sistema nacional de identificação e registo de bovinos
TMB - Tetrametilbenzidina
UMIB - Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica
 α - Nível de confiança
 μm - Micrómetro

1) Introdução

A presente dissertação sobre a “Prevalência de *Mycoplasma bovis* em 3 OPP portuguesas: estudo sero-epidemiológico”, resulta do encontro entre oportunidade e vontade. Oportunidade criada pela abertura de vagas no Mestrado Integrado em Medicina Veterinária para os licenciados no regime pré-Tratado de Bolonha, coincidente com a vontade de academicamente potenciar as competências adquiridas no passado com as experiências profissionais entretanto vividas.

Sendo enquadrado como um estágio em actividades de investigação, a sua realização envolveu planeamento conceptual e temporal, angariação de financiadores, selecção de Organizações de Produtores Pecuários (OPP) com características adequadas ao projecto, trabalho de campo na recolha de amostras de sangue, realização de questionários, trabalho de laboratório, tratamento e análise dos dados obtidos e concretização da presente dissertação.

A actividade profissional que exercemos na área da buiatria motivou a escolha do tema prevalência de micoplasmose bovina em 3 OPP portuguesas. Tem vindo a ser discutido na comunidade científica internacional o papel, impacto e importância de *Mycoplasma bovis* como agente patogénico envolvido no complexo respiratório bovino, mastite, queratoconjuntivite, otite e artrite em bovinos. Em Portugal tem sido esporadicamente descrita a sua presença em bovinos de carne e de leite, não sendo contudo conhecida a epidemiologia do agente nas condições pecuárias portuguesas.

O objectivo da presente dissertação foi, nesse sentido, obter uma “fotografia” inicial, imprecisa, sobre o grau de exposição de bovinos ao agente nas explorações Portuguesas, para que de futuro exista uma base de trabalho orientadora sobre *Mycoplasma bovis* e o seu papel na doença bovina no nosso país. Sendo a presença de anticorpos específicos indicadora de infecção prévia, por motivos económico-logísticos, optou-se pela abordagem serológica e não pela detecção da presença do agente propriamente dito. Foram então seleccionadas 3 áreas geográficas de Portugal Continental bem definidas, em que as características das explorações diferem na sua vocação produtiva e respectivo maneio: OPP de Vila do Conde (Norte, bovinos leiteiros em regime intensivo), OPP de Acripinhal (Centro, bovinos de engorda em regime intensivo) e OPP do Campo Branco (Sul, bovinos de carne em regime extensivo). Após selecção aleatória da amostra representativa para cada uma delas, foram realizadas recolhas de sangue individual e questionários presenciais, visando esclarecer a epidemiologia da micoplasmose bovina nas OPP

referidas e se possível, fornecer elementos para futuras investigações relativas ao agente.

Adicionalmente, como objectivo pessoal, pretendemos aprofundar conhecimentos e aperfeiçoar metodologias na área específica da investigação científica de aplicação prática: delineamento de protocolos experimentais exequíveis; concretização do trabalho de campo; recolha e tratamento de dados; análise crítica dos resultados e redacção em linguagem compatível com apresentação em congressos ou publicações.

O projecto teve início em Janeiro de 2008 com a selecção do tema, delineamento de objectivos e plano de acção. Seguiu-se a angariação de financiamento (Bayer Saúde Animal e CIISA), selecção das 3 OPP e de explorações para estudos de caso, tendo sido realizada a recolha de 3901 amostras de sangue individuais, pertencentes a 125 explorações, entre Fevereiro de 2008 e Março de 2009. Entre Julho de 2008 e Março de 2009 foram realizados os testes de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) no laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa (FMV-UTL), sendo finalizada a dissertação em Setembro de 2009.

1.1) Aspectos históricos

Mycoplasma bovis foi pela primeira vez isolado em 1961 nos Estados Unidos da América (E.U.A.) a partir de um surto de mastites em bovinos (Hale, Helmboldt, Platridge & Stula, 1962), tendo sido inicialmente classificado como *Mycoplasma bovimastitidis*. Devido à semelhança do quadro clínico que provocava com a agalaxia contagiosa ovina provocada por *Mycoplasma agalactiae*, foi depois classificado como *Mycoplasma agalactiae subsp. bovis*. Só em 1976, na sequência de estudos baseados em técnicas moleculares, foi estabelecida a espécie *Mycoplasma bovis* (Askaa & Ernø, 1976). Desde então, provavelmente devido à movimentação animal (Nicholas & Ayling, 2003), tem sido descrito em vários países: Israel (1964), Espanha (1967), Austrália (1970), França (1974), Inglaterra (1975), Checoslováquia (1975), Alemanha (1977), Dinamarca (1981), Suíça (1983), Marrocos (1988), Coreia do Sul (1989), Irlanda do Norte (1993), República da Irlanda (1994), Chile (2000) (Nicholas & Ayling, 2003), Japão (2000) (Maeda et al., 2003), Grécia (Filioussis, Christodouloupoulos, Thatcher, Petridou & Bourtzzi-Chatzopoulou, 2007), Brasil (Marques et al., 2007), Bósnia Herzegovina (Rifatbegovic, Assunção,

Poveda & Pasic, 2007) e Itália (Radaelli, Luini, Loria, Nicholas & Scanziani, 2008). Em Portugal Atalaia (1983) descreve o primeiro isolamento de *M. bovis* a partir de leite de bovino, tendo outros autores referido a sua presença em efectivos nacionais (Machado & Atalaia, 1987; Gonçalves, 1990; Antunes et al. 2008; Pinho et al., 2008; Preto (comunicação pessoal, Abril de 2008).

Ainda que subestimado, actualmente é apontado como um importante agente responsável por doença respiratória, mastite, artrite, queratoconjuntivite e otite média em bovinos (Nicholas & Ayling, 2003; Alberti et al., 2006; Foster, Naylor, Howie, Nicholas & Ayling, 2009).

1.2) Taxonomia

Mycoplasma bovis pertence à classe *Mollicutes*, ordem *Mycoplasmatales* e género *Mycoplasma* (Razin, Yogev & Naot, 1998).

A classe *Mollicutes* tem 5 ordens e 6 famílias, pertencendo os géneros mais estudados às ordens *Mycoplasmatales* (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*), *Entomoplasmatales* (*Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*), *Acholeplasmatales* (*Acholeplasma*) e *Anaeroplasmatales* (*Anaeroplasma*, *Asteroleplasma*) (Prescott, Harley & Klein, 2008).

Os membros da classe *Mollicutes* são comumente apelidados de micoplasmas (Prescott et al., 2008). O género *Mycoplasma* inclui mais de 120 espécies, algumas das quais patogénicas para humanos, outras para animais e outras para plantas (Foddai et al., 2005) (Tabela 1). Com base na análise da sequência do rRNA 5S, sabe-se que os micoplasmas se relacionam filogeneticamente com algumas bactérias Gram positivas, como as espécies do género *Clostridium*, que possuem uma baixa relação guanina-citosina (Quinn, Markey, Carter, Donnelly & Leonard, 2005).

Tabela 1. Espécies de *Mycoplasma* com importância veterinária, doenças que provocam e distribuição geográfica (Adaptado de Quinn et al., 2005).

Espécies de <i>Mycoplasma</i>	Hospedeiro	Doença	Distribuição geográfica
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC(colônia pequena)	Bovinos	Peripneumonia contagiosa bovina	Endêmica em zonas de África, Médio oriente e Ásia, surtos esporádicos em alguns países Europeus
<i>M. bovis</i>	Bovinos	Mastite, pneumonia, artrite	Mundial
<i>M. agalactiae</i>	Ovinos, caprinos	Agalactia contagiosa	Europa, Norte de África, Ásia ocidental
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i> (F38)	Caprinos	Pleuropneumonia contagiosa caprina	Norte e Este de África, Turquia
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	Ovinos, caprinos	Septicemia, mastite, poliartrite, pneumonia	África, Europa, Austrália, Estados unidos da América
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> LC(colônia grande)	Caprinos, ovinos	Pleuropneumonia, mastite, septicemia, poliartrite	Médio Este, América do Norte, Índia e zonas da Europa
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	Caprinos	Septicemia, pleuropneumonia, artrite, mastite	Zonas da Ásia, África, Europa, Austrália
<i>M. hyopneumoniae</i>	Suínos	Pneumonia enzootica	Mundial
<i>M. hyorhinis</i>	Suínos (3 a 10 semanas de idade)	Poliserosite	Mundial
<i>M. hyosynoviae</i>	Suínos (10 a 30 semanas de idade)	Poliartrite	Mundial
<i>M. gallisepticum</i>	Frangos, perús	Doença respiratória crônica, sinusite infecciosa	Mundial
<i>M. synoviae</i>	Aves	Sinovite infecciosa	Mundial
<i>M. meleagridis</i>	Perús	Aerosaculite, deformação óssea, crescimento e incapacidade diminuídas	Mundial
<i>M. arginini</i>	Ovinos, caprinos	Pneumonia, artrites, vaginites, oftalmia contagiosa, mastite	Desconhecida

1.3) Características de *Mycoplasma bovis*

Os micoplasmas são as mais pequenas células procariotas com capacidade de auto replicação, sendo microorganismos pleomórficos, cuja morfologia varia de esférica (0,3 a 0,9 µm de diâmetro) a filamentosa (até 1,0 µm de comprimento). Não tendo a capacidade de sintetizar peptoglicano ou seus precursores, carecem de parede celular rígida, apresentando membranas externas flexíveis com 3 estratos, sendo susceptíveis à dissecação, ao calor, aos detergentes e aos desinfetantes (Quinn et al., 2005).

1.3.1) Características culturais

Os micoplasmas apresentam um crescimento fastidioso e necessitam de meios enriquecidos para se desenvolverem. *M. bovis* cresce numa grande variedade de meios, originando no agár, em 3-5 dias, colônias com forma de “ovo estrelado”, devido ao seu crescimento em profundidade no centro e crescimento superficial na

periferia (Nicholas & Baker, 1998; Pitcher & Nicholas, 2005). Em meios apropriados, como o meio de Eaton, *M. bovis* produz películas e colônias isoladas, conferindo uma cor alaranjada ao meio (Pitcher & Nicholas, 2005). Inibição de crescimento, imunofluorescência e testes de inibição metabólica podem ser igualmente utilizados na identificação do *M. bovis* (Poveda & Nicholas, 1998). A maioria dos micoplasmas são anaeróbios facultativos e alguns crescem em condições ótimas numa atmosfera com 5-10% de CO₂ (Prescott et al., 2008). Ainda que a maioria dos micoplasmas não tenha capacidade de mobilidade, alguns conseguem deslizar sobre superfícies líquidas. A maioria das espécies difere da grande maioria das bactérias por necessitarem de esteróis para o seu crescimento. Devido à ausência de parede celular, coram como as bactérias Gram negativas com o método de Gram (Prescott et al., 2008).

O metabolismo dos micoplasmas é peculiar, uma vez que, não possuindo algumas vias bioquímicas, necessitam de meios com esteróis, ácidos gordos, vitaminas, aminoácidos, purinas e pirimidinas para o seu crescimento (Prescott et al., 2008). *M. bovis* é bioquimicamente semelhante a *M. agalactiae* uma vez que não fermenta a glucose, não hidrolisa a arginina, usando ácidos orgânicos, lactato e piruvato como fonte de energia (Miles, Wadher, Henderso & Mohan, 1988). A tabela 2 sumariza as propriedades bioquímicas de *M. bovis*, bem como de outros micoplasmas (Nicholas & Ayling, 2003).

Tabela 2. Propriedades bioquímicas comparativas de micoplasmas bovinos, incluindo *M. bovis* (Adaptado de Nicholas & Ayling, 2003).

Micoplasma	Glucose	Arginina	Urease	Filme	Caseína	Fosfatase	Tetrazolium	
							Aeróbio	Anaeróbio
<i>M. bovis</i>	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>M. bovirhinis</i>	+	-	-	-	+/-	+/-	+	+
<i>M. bovigenitalium</i>	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>M. bovoculi</i>	+	-	-	+	-	+/-	+	+
<i>M. canis</i>	+	-	-	-	+/-	-	-	+
<i>M. californicum</i>	-	-	-	-	d	+	-	maioria das estirpes +
<i>M. canadense</i>	-	+	-	-	d	fracamente +	-	+
<i>M. dispar</i>	+	-	-	-	d	-	+	+
<i>M. mycoides</i> SC	+	-	-	-	+	-	+	+
<i>U. diversum</i>	-	-	+	-	-	-	d	d

d: desconhecido

Apesar da fragilidade da maioria dos micoplasmas no ambiente, *M. bovis* pode sobreviver a 4 °C quase 2 meses em esponjas e no leite e aproximadamente 2

semanas na água. A temperatura superior, a sobrevivência decresce consideravelmente (Pfützner & Sachse, 1996). A sobrevivência do *M. bovis* em meio líquido enriquecido é de 59-185 dias, independentemente dos componentes do meio ou da temperatura (Nagatomo et al., 2001).

1.3.2) Características genómicas

O genoma dos micoplasmas é um dos mais reduzidos de entre os procariotas, com aproximadamente $5-10 \times 10^8$ daltons, e o seu conteúdo guanina-citosina varia entre 23% e 41% (Prescott et al., 2008). Existindo uma relação filogenética e grande variabilidade genética dentro de cada espécie de *M. bovis*, a diferenciação entre *Mycoplasma bovis* e *Mycoplasma agalactiae* deverá ser realizada com base em genes pouco variáveis dentro de cada espécie e que sejam específicos dessa espécie, como sejam os genes de replicação *uvrC* com 1716 bp em proteínas codificantes de 561 aminoácidos (Subramaniam et al., 1998).

1.4) Epidemiologia

M. bovis, não sendo ubiquitário, está amplamente presente na população bovina em áreas enzoóticas infectadas (Nicholas & Ayling, 2003). Os micoplasmas colonizam as superfícies mucosas da conjuntiva, cavidade nasal, orofaringe, glândula mamária e tracto intestinal e genital de humanos e animais. Algumas espécies possuem tropismo por determinadas regiões anatómicas, enquanto outros podem ser encontrados em várias localizações (Quinn et al., 2004). Em geral, cada espécie tem um hospedeiro específico, ainda que sejam referidas várias excepções na literatura (Pitcher & Nicholas, 2005). A infecção é geralmente introduzida em explorações livres de *M. bovis* por vitelos clinicamente sãos ou bovinos jovens que disseminam o agente. Uma vez estabelecida a infecção nos bovinos de uma exploração, a erradicação torna-se quase impossível (Nicholas & Ayling, 2003). A sua introdução em explorações com baixa incidência de doença respiratória pode conduzir a um aumento da morbilidade e da mortalidade (Gourlay, Thomas & Wyld, 1989). Os bovinos infectados excretam o agente através do tracto respiratório durante vários meses ou anos, funcionando como reservatório da infecção (Pfützner & Sachse, 1990). A infecção dos restantes animais ocorre através do tracto respiratório, canal do teto ou tracto genital, sendo a inseminação artificial outra das vias de infecção

comuns (Pfützner, 1990). O sémen congelado contaminado pode manter-se infectante por vários anos sendo provavelmente esta uma fonte de infecção subestimada (Nicholas & Ayling, 2003).

O tracto genital masculino pode ser infectado com *M. bovis* através do contacto com outros animais ou, eventualmente, a partir de um ambiente contaminado. A infecção do prepúcio ou uretra com *M. bovis* conduz a uma infecção ascendente dos testículos provocando orquites, vesiculites, decréscimo na qualidade do sémen e consequentemente excreção do agente no sémen (Kreusel et al., 1989).

***M. bovis* como agente de infecções respiratórias**

Nos vitelos, *M. bovis* pode ser responsável pelo desenvolvimento de pneumonia, associado ou não a outros microorganismos como *Pasteurella multocida* e/ou *H. somni*, que podem contribuir para as complicações no processo pneumónico (Buchvarova & Vesselinova, 1989).

Apesar de estar provada a relação entre *M. bovis* e a Doença Respiratória Bovina (DRB), o papel exacto do microorganismo na patogenia da doença é ainda controverso. Durante muitos anos, *M. bovis* foi considerado uma bactéria oportunista presente no tracto respiratório de bovinos saudáveis. Foi, no entanto, demonstrada a associação frequente entre *M. bovis* e lesões inflamatórias no pulmão de bovinos doentes e a sua ausência em animais saudáveis (Thomas, Dizier, Trolin, Mainil & Linden, 2002). São vários os estudos que confirmam *M. bovis* como a bactéria mais frequentemente identificada em bovinos de engorda afectados por pneumonias crónicas resistentes a tratamento antibiótico (Haines, Martin, Clark, Jim & Janzen, 2001) e em vitelos de carne com broncopneumonias fatais (Adegboye, Rasberry, Halbur, Andrews & Rosenbusch, 1995; Shahriar, Clark, Janzen, West & Wobeser, 2002; Gagea et al., 2006a). Adicionalmente, foi provado que a infecção por *M. bovis* compromete as defesas imunitárias dos hospedeiros (Gourlay et al., 1989; Poumarat et al., 2001; Vanden Bush & Rosenbusch, 2002, 2003; Gagea et al., 2006b) permitindo a invasão por outros agentes patogénicos respiratórios como *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* e *Histophilus somni* (Buchvarova & Vesselinova, 1989; Adegboye et al., 1995; Haines et al., 2001; Khodakaram-Tafti & López, 2004).

A co-infecção com BVDV (vírus da diarreia viral bovina) é frequentemente reportada, tendo sido sugerida a existência de um efeito sinérgico deste vírus com *M. bovis* nas infecções respiratórias (Shahriar et al., 2002).

M. bovis pode também ser responsável pelo desenvolvimento de artrites, como sequela da infecção respiratória ou de mastite provocada pelo agente (Pfützner, 1990), estando descritas algumas ocorrências ocasionais de queratoconjuntivite provocada por *M. bovis* (Kirby & Nicholas, 1996; Alberti et al., 2006).

***M. bovis* como agente de mastite**

As mastites provocadas por micoplasmas são mundialmente reconhecidas como um problema da indústria leiteira, sendo referidas por vários autores (Boughton, 1979; Jurmanova & Hajkova, 1983; Pfützner & Schimmel, 1985; Feenstra, Madsen, Friis, Meyling & Ahrens, 1991; Jackson & Boughton, 1991; Pfützner & Sachse, 1996; Ghadersohi, Hirst, Forbes-Faulkener & Coelen, 1999; Brice et al., 2000; Mackie, Finlay, Brice & Ball, 2000; Houlihan, Veenstra, Christian, Nicholas & Ayling, 2007).

As mastites causadas por micoplasma são consideradas como contagiosas; contudo, a evolução da afecção parece seguir o padrão das mastites ambientais, com surtos clínicos de doença (Bramley, 1992). A forma mais frequente de transmissão de *Mycoplasma* spp. como agente de mastites parece ser a introdução de animais de reposição infectados em explorações indemnes (Jasper, 1981; Gonzalez & Wilson, 2003). Nas explorações de grande dimensão, onde existe uma maior rotação de animais, existe um risco mais elevado de desenvolvimento de mastites por micoplasma (Thomas, Willeberg, & Jasper, 1981; Fox, Hancock, Mickelson & Britten, 2003) devido à introdução de animais infectados, ainda que estes por vezes sejam portadores assintomáticos (Fox, Kirk & Britten, 2005). Tal afirmação é suportada por relatos de casos onde a introdução de novos animais foi a fonte de surtos de mastite por micoplasma (Ruhnke, Thawley & Nelson, 1976; Gunning & Shepherd, 1996).

Os sinais clínicos associados a mastite por *M. bovis* podem por vezes apresentar uma evolução atípica envolvendo claudicação, edema das porções dos membros anteriores e poliartrites (Wilson et al., 2007). Os surtos de mastite por micoplasma são de duração variável, estando descritos surtos de duração inferior a 2 meses (Gunning & Shepherd, 1996; Fox et al., 2003), surtos com duração de vários meses (Brown et al., 1990; Jackson & Boughton, 1991; Bicknell, Gunning, Jackson, Boughton & Wilson, 1983) e surtos com vários anos (Bayoumi, Farver, Bushnell & Oliveria, 1988).

A monitorização da presença de mastites por micoplasmas é normalmente realizada através da cultura de leite de tanque da exploração (Farnsworth, 1993; Bray,

Shearer, Donovan & Reed, 1997; Gonzalez & Wilson, 2003). O pressuposto de que a presença de *Mycoplasma* spp. no leite de tanque é indicativa de que pelo menos um animal apresenta mastite por *Mycoplasma* spp., é confirmado por vários autores (Brown, Shearer & Elvinger, 1990; Bray et al., 1997) ao demonstrar por um lado a veracidade clínica da ocorrência e por outro, a baixa probabilidade da contaminação ambiental do leite do tanque (Bray et al., 1997). Nos E.U.A., através da cultura do leite do tanque, estima-se que 8-10% das explorações tenham pelo menos um animal com mastite causada por micoplasma (Jasper, Dellinger, Rollins & Hakanson, 1979; Kunkel, 1985; Kirk, Glenn, Ruiz & Smith, 1997; Fox et al., 2003). A Califórnia é uma das regiões com maiores problemas de mastites causadas por micoplasma, ainda que este dado possa reflectir o entusiasmo dos investigadores na procura do agente causal (Bramley & Dodd, 1984).

Apesar de os surtos de mastite por *Mycoplasma* spp. serem provocados maioritariamente pela introdução de novos animais nas explorações (Bushnell, 1984; Kirk & Lauerman, 1994; Fox et al., 2003; Gonzalez & Wilson, 2003), vários autores referem a possibilidade de outras vias de transmissão que não envolvem a introdução de animais infectados nas explorações, mas sim a transmissão a partir de animais co-habitantes assintomáticos, ou a partir de outros locais de infecção no mesmo animal, como vias respiratórias, articulações ou ouvido médio (Mackie et al., 2000; Fox et al., 2003; Lamm, Munson, Thurmond, Barr & George, 2004). Embora Bushnell (1984) refira que a mastite por micoplasma poderá ter origem na contaminação mecânica da glândula mamária a partir de infecções respiratórias ou urogenitais, esta teoria não é suportada por qualquer prova concreta. Existe contudo evidência de que pode ocorrer a transmissão de *Mycoplasma* sp. de órgãos internos extra-mamários para a glândula mamária, sendo possível isolar *Mycoplasma* sp. a partir do sangue e outros órgão internos de animais infectados experimentalmente por via intramamária (Bennett & Jasper, 1978; Jain, Jasper & Dellinger, 1969). Tal evidência suporta a hipótese da transmissão hematogena do agente, sugerindo os mesmos autores a possibilidade de transmissão do agente por via linfática, entre quartos infectados e não infectados (Jain et al., 1969; Bennett & Jasper, 1978). O isolamento da mesma estirpe de *Mycoplasma* sp. a partir de mastites, pneumonias e artrites em vitelos (Gonzalez, Jayaro, Oliver & Sears, 1993) sugere que a transmissão entre animais ocorreu através das descargas nasais e consequente transferência de *Mycoplasma* sp. do tracto respiratório para a glândula mamária ou articulações. No entanto, outros estudos contrariam esta hipótese, descrevendo

diferentes estirpes da mesma espécie de *Mycoplasma* nas vias respiratórias e glândula mamária (Feenstra et al., 1991).

É contudo aceite que os surtos de mastite por *Mycoplasma* spp., e *Mycoplasma bovis* em particular, são iniciados por animais com glândulas mamárias infectadas, sejam recém introduzidos ou residentes assintomáticos. A infecção da glândula mamária poderá então ter origem na transmissão interna do agente, por via hematógena ou linfática (via vertical) ou numa transmissão durante a ordenha (via horizontal) (Fox et al., 2005). Neste sentido, o controlo de *Mycoplasma bovis* como agente contagioso de mastite através de medidas de biossegurança não é tão eficiente como para outros agentes patogénicos, existindo dados indicadores do aumento da incidência de surtos de mastite por *M. bovis* através da via vertical atrás referida (Fox et al., 2005).

Em Portugal, o primeiro surto de mastite por *M. bovis* foi descrito por Pinho et al. (2008), numa exploração leiteira de Entre-Douro e Minho (EDM) com 160 animais, com presença de artrites, pneumonias e redução dos indicadores reprodutivos.

Especificidade de *M. bovis*

Considerando o seu pequeno genoma, capacidades biossintéticas limitadas e estilo de vida adaptado ao parasitismo, *M. bovis* parece ser específico de bovinos contudo foram relatados alguns isolamentos ocasionais em búfalos e pequenos ruminantes (Pitcher & Nicholas, 2005; Dyer, Hansen-Lardy, Krogh, Schaan & Schamber, 2008). Foram também relatados dois casos de isolamento de *M. bovis* no Homem. Num caso, *M. bovis* foi isolado a partir das vias respiratórias superiores de uma mulher que desenvolveu broncopneumonia após exposição prolongada a estrume de bovino (Madoff, Pixley, DelGiudice & Moellering, 1979). A doença foi controlada com administração de tetraciclina, tendo sido observado o desenvolvimento de anticorpos contra *M. pneumoniae*, mas não contra *M. bovis* durante o período de convalescença, sugerindo que *M. bovis* não foi o agente etiológico primário da infecção. Num segundo caso, *M. bovis* foi isolado de um paciente com doença respiratória que apenas respondeu ao tratamento com tetraciclina (Nicholas & Ayling, 2003), não tendo sido identificados outros agentes causadores de doença.

1.5) Patofisiologia

As lesões pulmonares em vitelos com infecção natural incluem broncopneumonia exudativa e extensos focos de necrose coagulativa rodeados por células inflamatórias. A infecção experimental de vitelos gnotobióticos por *M. bovis* induz pneumonias com envolvimento de aproximadamente 30% da superfície pulmonar, provocando doença respiratória clínica em alguns dos animais (Thomas, Howard, Stott & Parsons, 1986). As infecções crônicas são frequentemente associadas a pneumonia com invasão linfocítica com marcada hiperplasia do tecido linfóide peribrônquico responsável pela estenose compressiva das vias aéreas e consequente colapso do parênquima pulmonar adjacente. Os antígenos de *M. bovis* são principalmente detectados na periferia das áreas de necrose coagulativa, nos exsudados das zonas de necrose e associados aos infiltrados de macrófagos e neutrófilos (Rodriguez, Bryson, Ball & Forster, 1996).

A sazonalidade da ocorrência de pneumonias foi descrita no Reino Unido, onde as infecções em vitelos se iniciam em Novembro, tendo o seu pico em Janeiro; contudo as mortes provocadas por *M. bovis* continuam a ocorrer em algumas explorações no pastoreio de Primavera, representando recidivas de lesões pulmonares não resolvidas (Nicholas, Wood, Baker & Ayling, 2001).

M. bovis pode também ser responsável pelo desenvolvimento de artrites, como sequela da infecção respiratória ou de mastite provocada pelo agente (Pfützner, 1990). Nestes casos, existe claudicação, edema das articulações, temperatura elevada, e nos casos mais severos, redução da ingestão de alimento e debilidade. Estas consequências da infecção surgem geralmente 2-3 semanas após a estabulação, podendo também ocorrer após o transporte de vitelos durante longos períodos de tempo, sendo frequente a ineficácia da terapêutica antimicrobiana.

Em vacas gestantes, a infecção pode resultar em aborto ou parto prematuro de vitelos com pneumonia e artrite, podendo 50% dos animais infectados apresentar retenção placentária no pós-parto (Stipkovits & Szathmary, 2008).

A queratoconjuntivite está também descrita como consequência de infecção por *M. bovis*, podendo ser severa e implicar a perda de visão (Kirby & Nicholas, 1996; Alberti et al., 2006).

A infecção por *M. bovis* pode ainda assumir quadros clínicos menos frequentes, nomeadamente otite média em associação com pneumonia, tal como descrito no Japão, com morbilidade e mortalidade estimadas em 8-40% e 30-100%

respectivamente (Maeda et al., 2003). Em 8 destes animais, com corrimento auricular e otite média exudativa, foi isolado *M. bovis* a partir de zaragatoas nasais e amostras recolhidas post-mortem de canal auditivo, pulmões, linfonodos, cérebro e coração. À necrópsia foram observados exsudados purulentos na bula timpânica de todos os animais, e abscessos na porção petrosa do osso temporal e nos pulmões de 7 vitelos. Os exsudados da bula timpânica eram constituídos por uma mistura de neutrófilos, fragmentos de células e fibrina, estando a mucosa timpânica espessada com infiltração neutrofílica e macrofágica e proliferação de tecido fibroso conjuntivo. As lesões pulmonares incluíam focos de necrose coagulativa rodeados por neutrófilos. Os hepatócitos e células tubulares renais estavam aumentados com inclusões hialinas citoplasmáticas em 4 vitelos. Foi confirmada, por imunohistoquímica, a presença de antígenos de *M. bovis* no citoplasma das células inflamatórias do ouvido médio, osso temporal, pulmões e inclusões citoplasmáticas dos hepatócitos e epitélio tubular, tendo sido identificados microorganismos com 200-500 µm de diâmetro nos hepatócitos, epitélio tubular e axónios dos nervos faciais. Este estudo permitiu comprovar a capacidade de *M. bovis* se disseminar por diversos órgãos internos e a capacidade de invasão de vários tipos de células do hospedeiro, sendo a localização intracelular vantajosa na evasão à resposta imunitária do hospedeiro (Maeda et al., 2003). O processo de citoaderência, fundamental para o estabelecimento da infecção natural, foi demonstrado pela capacidade de *M. bovis* para aderir a neutrófilos e células embrionárias de pulmão de bovino (Thomas et al., 2003).

M. bovis desempenha um papel de relevo no desenvolvimento de DRB. Estudos recorrendo a imunohistoquímica, anatomia patológica, serologia e bacteriologia, sugerem que a infecção com *M. bovis* pode originar broncopneumonia necrosupurativa severa, pneumonia intersticial se associada a um elevado número de organismos dentro das lesões ou, alternativamente, uma pneumonia catarral moderada se associada a um reduzido número de organismos dentro das lesões (Radaelli et al., 2008).

Para melhor compreender a interacção entre *M. bovis* e hospedeiro bovino, foi caracterizada a resposta imunitária gerada por uma infecção experimental com *M. bovis*. Foi demonstrado que *in vitro*, os antígenos de *M. bovis* estimulam a activação de linfócitos CD4+ e CD8+ de uma forma consistente com a presença de células memória e que as células T são activadas pelos antígenos de uma forma consistente com a imunidade inata. A análise serológica demonstrou que a infecção por *M. bovis* aumentou a produção de IgG1 específica, tendo pouca influência na

produção de IgG2, propondo Vanden Bush & Rosenbusch (2003) que a infecção experimental de pulmão de bovino resulta numa resposta imunitária predominantemente mediada por células Th2, isto é, uma resposta imunitária específica.

Após a incubação com *M. bovis*, os macrófagos alveolares são activados e produzem TNF- α e óxido nítrico (Jungi, Krampe, Sileghem, Griot & Nicolet, 1996). Por outro lado, *M. bovis* demonstra também uma acção depressora do sistema imunitário, inibindo a desgranulação de neutrófilos e da sua capacidade oxidativa (Finch & Howard, 1990; Thomas et al., 1991). Foi ainda demonstrada a sua capacidade para induzir apoptose de linfócitos *in vitro* (Vanden Bush & Rosenbusch, 2002). Apesar das propriedades deletérias de *M. bovis* para os linfócitos, os bovinos infectados geram uma resposta imunitária celular e humoral mensurável (Howard, Stott, Thomas, Gourlay & Taylor 1987), sendo inclusivamente esta resposta imunitária responsável por algumas das lesões de pneumonia associada a *M. bovis* (Vanden Bush & Rosenbusch, 2003).

A inoculação de *M. bovis* na glândula mamária conduz à síntese de proteínas de fase aguda em 108 horas, indicando uma resposta sistémica à infecção (Kauf, Rosenbusch, Paape & Bannerman, 2007). Entre as 84 e as 168 horas pós-infecção foi observada neutropénia, enquanto linfopénia e trombocitopénia foram observadas entre as 84 horas após a infecção e o final do estudo (10 dias). A contagem de células somáticas no leite aumentou 66 horas após a infecção e permaneceu elevada até ao final, relativamente ao período inicial. As concentrações de albumina sérica bovina no leite, indicando permeabilidade da barreira epitélio-endotelial mamária, aumentaram a partir das 78 horas. A concentração de várias citocinas, como IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-12 e TNF- α , aumentou como resposta à infecção, tendo permanecido elevada até ao final do estudo. A activação do complemento, demonstrada pelo aumento do factor 5 do complemento foi também observada durante vários dias. Apesar das evidências de que os animais desenvolveram uma resposta imunitária prolongada como resposta à infecção por *M. bovis*, todos os quartos permaneceram infectados ao longo do estudo, apresentando concentrações elevadas da bactéria. Neste sentido, a resposta inflamatória (não específica) parece não ser suficiente para eliminar *M. bovis* da glândula mamária, sendo contudo indicadora da tentativa do hospedeiro para eliminar o agente (Kauf, Rosenbusch, Paape & Bannerman, 2007).

1.6) Impacto económico

Estima-se que as perdas económicas associadas a *M. bovis* sejam elevadas, tanto na indústria da carne como na indústria leiteira. Nicholas & Ayling (2003) estimam que, na Europa, *M. bovis* seja responsável por 25% a 33% dos problemas respiratórios em vitelos. Só no Reino Unido, cerca de 1,9 milhões de bovinos são anualmente afectados por problemas respiratórios, com um custo aproximado de 54 milhões de libras (Reeve-Johnson, 1999). Na Bélgica, as perdas devido a problemas respiratórios são estimadas em 125 milhões de euros por ano (Gevaert, 2006). Nos E.U.A., os custos anuais associados a *M. bovis* são estimados em 32 milhões de dólares em consequência de perdas de peso e penalizações no valor da carne (Rosengarten & Citti, 1999). Na indústria leiteira, onde só mais recentemente se tem atribuído importância ao agente e efectuado um esforço de diagnóstico, as perdas podem ser ainda mais elevadas comparativamente aos problemas respiratórios, sendo estimadas em 108 milhões de dólares por ano nos E.U.A. (Rosengarten & Citti, 1999). Não encontramos, na literatura consultada, dados referentes a Portugal.

1.7) Diagnóstico

1.7.1) Métodos culturais

Os sintomas e lesões provocados por *M. bovis* não são exclusivos do agente, pelo que a sua identificação laboratorial é indispensável para o diagnóstico etiológico. As amostras preferenciais para a identificação de *M. bovis* são indicadas na Tabela 3.

Tabela 3. Amostras adequadas para diagnóstico de doenças causadas por *M. bovis* (Adaptado de Nicholas & Ayling, 2003).

Doença	Zaragatoas nasais/ LBA ^a /pulmão afectado	Leite	Líquido articular/sinovial	Zaragatoas oculares	Sémen / descarga genital / lavagens prepúciais	Soro para detecção de anticorpos
Pneumonia Mastite Artrose Querat. ^b Infertilidade	√	√	√	√	√	√ √ √ √ √

a Lavagem Alveolar Brônquica.

b Queratoconjuntivite.

A lavagem broncoalveolar, apesar de menos prática, é mais sensível na detecção de agentes patogénicos do tracto respiratório posterior, incluindo *M. bovis*, do que as zaragatoas nasais (Thomas et al., 2002). De salientar que a presença do microorganismo nas vias aéreas anteriores não significa necessariamente infecção (Nicholas & Ayling, 2003).

O diagnóstico de mastite por micoplasma é geralmente efectuado através do isolamento e identificação do agente por métodos culturais (Gonzalez & Wilson, 2003). Para a identificação presuntiva de *Mycoplasma* sp., é aconselhada a cultura de leite no meio modificado de Hayflick, incubado a 37 °C durante 7-10 dias em 10% CO₂ (Hogan et al., 1999). Para evitar a identificação de uma espécie de *Mycoplasma* sp. não patogénica, é aconselhável realizar identificação de espécie após cada diagnóstico presuntivo.

Mycoplasma sp. é sensível à congelação, existindo uma redução de vários logaritmos no número de microorganismos no leite com este tipo de preservação (Biddle, Fox, Hancock, Gaskins & Evans, 2004). Neste sentido, é recomendável que as amostras de leite sejam primeiro propagadas para meio de enriquecimento e só depois realizadas as culturas nas placas de agar, aumentando assim a probabilidade de detecção de *Mycoplasma* sp. e reduzindo os resultados falso-negativos (Biddle et al., 2004).

1.7.2) Métodos serológicos

O isolamento de *M. bovis* a partir de pulmões ou leite contaminados nem sempre é possível, particularmente em casos crónicos, em situações de tratamentos antibióticos prolongados, deterioração das amostras, contaminação bacteriana (Nicholas & Ayling, 2003) ou excreção intermitente do agente no leite (Bidle, Fox & Hancock, 2003). Neste sentido, técnicas imunohistoquímicas, preferencialmente utilizando anticorpos monoclonais, podem ser úteis na identificação de antígenos de *M. bovis* nos tecidos afectados (Adegboye et al., 1995).

Ball & Findlay (1998) desenvolveram um método de ELISA de captura para evidenciar antígenos de *M. bovis*, onde anticorpos monoclonais específicos são fixados à microplaca, capturando o antígeno de *M. bovis* a partir do meio testado. Este teste tem uma sensibilidade semelhante ao diagnóstico cultural, estando disponível comercialmente (Bio-X Pulmotest Bio K 341, Bio X, Bélgica).

A detecção de anticorpos contra *M. bovis* no soro de bovinos é referida como uma forma mais fiável de diagnóstico da infecção, pois os níveis de anticorpos no soro detectados por ELISA mantêm-se elevados durante vários meses (até 300 dias) (Gevaert, 2006). Tal abordagem faz especialmente sentido em explorações onde existe uma elevada taxa de utilização de antibióticos, responsável pela dificuldade acrescida no isolamento do agente, ou em infecções crónicas, onde o isolamento é difícil (Nicholas, 1997). A presença de anticorpos específicos é indicativa de infecção, uma vez que animais onde *M. bovis* é apenas encontrado nas vias aéreas anteriores raramente seroconvertem (Nicholas & Ayling, 2003).

O ELISA indirecto, utilizando antígenos totais ou modificados, é o método mais utilizado (Nicholas et al., 2000), estando disponíveis diversos testes comerciais (Bommelli, Suíça; Biovet, Canadá; Bio-X, Bélgica). A utilização de testes de ELISA para a detecção precisa de anticorpos no leite está também descrita, tendo demonstrado a sua capacidade para identificar quartos individuais infectados (Byrne et al., 2000).

No que respeita a mastite, é importante realçar que a detecção de anticorpos contra *Mycoplasma bovis* é indicativa de infecção, mas não necessariamente de localização intra-mamária. Adicionalmente, tendo *M. bovis* tropismo para vários tecidos-alvo, sendo o pulmão e as articulações os mais frequentes, o diagnóstico de mastite através de serologia deverá ser realizado com precaução. Mesmo que anticorpos anti-*Mycoplasma bovis* sejam identificados no leite, a sua origem não é clara, podendo estes resultar de uma resposta imunitária local ou de uma resposta a uma infecção extra-mamária concomitante com uma infecção intra-mamária de etiologia diferente (Byrne et al., 2000). Por este motivo, no diagnóstico de mastite por *Mycoplasma bovis*, é aconselhável confirmar os resultados do rastreio serológico por cultura de leite.

Os testes de ELISA têm sido utilizados com sucesso para seleccionar explorações livres de *M. bovis* após a crise da BSE na Irlanda (O'Farrell et al., 2001). A utilização deste tipo de teste é inclusivamente aconselhada na vigilância para manutenção de explorações livres de *M. bovis* através da testagem dos animais comprados antes da sua introdução na exploração. Testes de diagnóstico ELISA ainda mais específicos deverão surgir num futuro próximo, através da utilização de antígenos recombinantes com proteínas de superfície variáveis, expressas em *E. coli* (Brank et al., 1999).

Estão ainda descritos outros métodos serológicos para identificação de *M. bovis*, como hemaglutinação indirecta ou electroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *imunoblotting* (Nicholas, Baker, Ayling & Stipkovits, 2000b; Rifatbegovic, Assunção & Pasic, 2009). No entanto, estes testes são de mais difícil execução, pelo que estão menos difundidos.

1.7.3) Métodos de biologia molecular

M. bovis pode facilmente ser inibido pelo crescimento de outros micoplasmas oportunistas como *M. bovirhinis* e acholeplasmas, podendo ocasionalmente a variabilidade antigénica destas espécies tornar os testes serológicos de captura pouco fiáveis (Ayling, Nicholas & Johansson, 1997). Nestas situações, o método de reacção em cadeia da enzima polimerase (PCR) é bastante conveniente. As primeiras técnicas de PCR, baseadas nos genes 16S rRNA, amplificavam para além de *M. bovis*, o ácido desoxiribonucleico (DNA) de *M. agalactiae* (Pfützner & Sachse, 1996; Ayling et al., 1997). Contudo, as técnicas mais recentes do método de PCR baseiam-se na amplificação do gene *uvrC* uma vez que este parece ser suficientemente estável e específico de cada espécie (Subramaniam et al., 1998; Frey, Subramaniam, Bergonier & Nicolet, 1999).

O método de PCR está descrito como eficaz na detecção de *M. bovis* directamente a partir de amostras de descargas nasais e leite (Hotzel, Sachse & Pfutzner, 1996) e até a partir de leite tratado (Pinnow et al., 2001).

São vários os autores que têm recorrido à metodologia de PCR para o estudo de *M. bovis*: Ghadersohi et al. (1999) utilizaram uma técnica de PCR altamente sensível e específica em estudos preliminares para investigar a associação da presença de *M. bovis* e contagens elevadas de células somáticas; Wiggins et al. (2007) utilizaram métodos culturais e PCR para identificar *M. bovis* em vitelos de engorda na Geórgia; Foddai et al. (2005) demonstraram que o gene *ma(mb)-mp81* é específico de espécie e que a metodologia de PCR baseada neste gene pode ser uma forma precisa e rápida para a identificação correcta de *M. agalactiae* e *M. bovis*, com aplicação no diagnóstico, vigilância e investigação dos agentes. Cai, Rogers, Parker & Prescott (2005) desenvolveram uma técnica de PCR em tempo real para identificação de *M. bovis* a partir de pulmão de bovino.

As técnicas de diagnóstico envolvendo ácidos nucleicos têm o potencial para reduzir os resultados falsos positivos, uma vez que podem pesquisar aspectos específicos e únicos do genoma de cada espécie (Fox et al., 2005).

1.8) Terapêutica

Pfützner (1990) refere que as doenças provocadas por *M. bovis* seriam resistentes a qualquer quimioterapia. No entanto, os antibióticos são amplamente utilizados de uma forma correcta no combate de infecções bacterianas secundárias, mas por vezes de uma forma ineficiente no tratamento da infecção por micoplasma.

As recomendações para o tratamento de infecções por micoplasmas consistem em antibioterapia prolongada e agressiva (Hirsh, 2000). Contudo, na maioria das situações, o tratamento parece ter eficácia bastante limitada (Nicholas & Ayling, 2003). Os antibióticos com actividade conhecida contra os micoplasmas incluem fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclina, lincosamidas, aminoglicosídeos e cloranfenicol (cuja administração não é permitida em animais de produção) (Hirsh, 2000), estando na Europa descritas resistências crescentes de *Mycoplasma bovis* a algumas moléculas como oxitetraciclina, espectinomicina e tilmicosina (Ayling, Baker, Peek, Simon & Nicholas, 2000).

As técnicas convencionais não podem ser utilizadas para a determinação da sensibilidade de micoplasmas aos agentes antimicrobianos, uma vez que aqueles apresentam requisitos especiais para o seu crescimento. Em medicina veterinária, as concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram determinadas por diversos autores utilizando diferentes metodologias (Poumarat & Martel, 1989; Cooper, Fuller, Fuller, Whittlestone & Wise, 1993; ter Laak, Noordergraaf & Verschure, 1993; Ball, Reilly & Bryson, 1995; Hannan, Windsor, de Jong, Schmeer & Stegemann, 1997; Ayling et al., 2000), pelo que é difícil comparar os resultados. Hannan (2000) sugere procedimentos e recomendações para a determinação das CIM para as espécies de micoplasmas com interesse veterinário.

Francoz, Fortin, Fecteau & Messier (2005) utilizaram o E-test para determinar a susceptibilidade de *M. bovis* a várias moléculas, tendo demonstrado a eficácia da enrofloxacin e a resistência adquirida à tetraciclina, espectomicina, azitromicina e clindamicina.

Outros estudos *in vitro* comparam a susceptibilidade de *M. bovis* a várias moléculas (ter Laak et al., 1993; Ball et al., 1995; Ayling et al., 2000; Froyman & Perzo, 2005), sendo os resultados apresentados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Eficácia dos antibióticos *in vitro* contra estirpes de campo de *M. bovis* (concentrações inibitórias mínimas µg/ml) (Adaptado de Nicholas & Ayling, 2003).

País (fonte)	Nº de estirpes	Enrofloxacin/ danofloxacin	Lincomicina	Spectinomicina	Tilosina	Tilmicosina	Oxitetraciclina
Holanda (ter Laak et al., 1993)	19	0,5-2/ND	0,25-1	1-4	0,06-4	ND	8 a >64
N. Ireland (Ball et al., 1995)	23	1-2/ND	0,125-2	4-6	ND	0,06-0,5 (9 estirpes) 4 a > 32 (14 estirpes)	ND
Italy	23	0,06-0,25/ND	0,25-1	0,12-2	0,12-4	16 a >32	0,12-4
Grã-Bretanha (Ayling et al., 2000)	62	ND/0,125-2	ND	1-8 (50 estirpes) 128 a >128 (12 estirpes)	ND	4 a <128	1-128

Interpretação (Adaptado de ter Laak, Noordergraaf & Boomsliiter, 1992a; ter Laak, Noordergraaf & Dieltjes, 1992b): >1 µg/ml: micoplasmas susceptíveis; 2-4 µg/ml: micoplasma evidencia susceptibilidade intermédia; >8 µg/ml: micoplasmas resistentes.
ND: não determinado.

Tabela 5. Eficácia dos antibióticos *in vitro* contra estirpes de campo de *M. bovis* isolados em França (2004-2005) (Adaptado de Froyman & Perzo, 2005).

		Enrofloxacin	Marbofloxacin	Danofloxacin	Florfenicol	Doxiciclina	Tilmicosina	Tulatromicina
Estirpes de Referência								
	CNEVA 1067	0,25	0,5	0,5	4	1	0,25	1
	ATCC 27368	0,25	0,5	0,5	4	4	0,25	0,25
Estirpes de Campo								
	#1	0,25	0,5	0,25	4	2	4	16
	#2	0,12	0,25	0,12	4	1	4	16
	#3	0,25	0,5	0,5	4	0,5	64	8
	#4	0,5	0,5	0,5	4	16	>256	128
	#5	0,25	0,25	0,25	2	0,5	128	8
	#6	0,25	0,25	0,25	2	4	128	8
	#7	0,25	0,5	0,25	2	0,5	>256	8
	#8	0,5	0,5	0,5	2	0,5	>256	8

Interpretação: MIC (µg/mL) de 2 estirpes de referência e de 8 estirpes de *Mycoplasma bovis* isoladas em França entre 2004 e 2005.

De salientar que antibióticos ineficazes *in vitro* são ineficazes *in vivo*, mas o contrário pode não ser verdade, ou seja, antibióticos eficazes *in vitro* podem não ser eficazes *in vivo* (Ayling et al., 2000).

Wendt, Lenzke & Petrov (2002) descreveram um protocolo de tratamento de mastites clínicas provocadas por *Mycoplasma* spp. e outros agentes, utilizando enrofloxacin 5% durante 3 dias consecutivos, indicando sucesso terapêutico na cura clínica e bacteriológica das mastites, incluindo as causadas por *Mycoplasma* spp.. Os dados apresentados por este autor são concordantes com os apresentados por Aduriz, Escobal, Salazar, Contreras & Marco (1996) que descrevem a cura de mastites por *M. bovis* com o mesmo protocolo de tratamento. Stipkovits, Ripley, Varga & Palfi (2001) reportaram sucesso no tratamento de pneumonias e artrites em vitelos através da utilização de valnemulina no leite de vitelos durante 3 semanas. Nicholas, Ayling, Woodger, Wessells & Houlihan (2006) referem a utilização de tulatromicina (Draxxin, Pfizer) para o tratamento de pneumonias e mastites por *M. bovis* e da danofloxacin (Advocin, Pfizer) para o tratamento de artrites por *M. bovis*.

Apesar de relatos bem sucedidos com tratamentos em que foram utilizados fármacos antimicrobianos, os estudos atrás referidos parecem sugerir que as estirpes de *M. bovis* na Europa estão a desenvolver resistência aos antibióticos tradicionalmente utilizados no combate ao agente, particularmente as oxitetraciclina, tilmicosina e espectinomicina (Ayling et al., 2000). As fluoroquinolonas parecem ser as mais eficazes, mas o seu uso em animais para consumo humano é cada vez mais controverso (Ayling et al., 2000; Froyman & Perzo, 2005; European Medicines and Inspections Agency, 2006).

1.9) Abordagens de controlo

A eficácia relativa da quimioterapia no controlo das infecções por *M. bovis* tem conduzido a atenção para a possibilidade do desenvolvimento de vacinas. Surpreendentemente, não existem actualmente vacinas disponíveis, apesar de vários autores referirem o sucesso da imunização em estudos de campo: uma vacina inactivada com vírus respiratório sincicial bovino, vírus da parainfluenza tipo 3 (PI3V), *M. dispar* e *M. bovis* demonstrou conferir alguma protecção contra a doença respiratória (Boothby, Jasper & Thomas, 1987); uma autovacina com estirpes inactivadas de *M. bovis* e *M. haemolytica* reduziu as perdas por pneumonias e os custos de tratamento em vitelos de engorda introduzidos numa exploração (Urbanek, Leibig, Forbrig & Stache, 2000); uma vacina inactivada demonstrou ser segura, altamente imunogénica e protectora contra a infecção experimental provocada por uma estirpe virulenta de *M. bovis* (Nicholas, Ayling & Stipkovits,

2002). Os vitelos vacinados demonstraram sintomas respiratórios ligeiros, enquanto que os vitelos não vacinados desenvolveram sintomas de pneumonia, acompanhados por uma diminuição estatisticamente significativa dos ganhos de peso e um aumento significativo nas lesões pulmonares e temperaturas rectais, bem como uma redução na disseminação de *M. bovis* para os órgãos internos, incluindo articulações (Nicholas et al., 2002). Recentemente outros autores tentaram, sem sucesso, a utilização de uma vacina em vitelas de substituição (Maunsell, Donovan, Risco & Brown, 2009).

Tentativas de vacinação contra mastites provocadas por *M. bovis* não só foram ineficazes como inclusivamente agravaram a severidade da afecção (Ross, 1993). A vacinação de vacas em fase terminal de gestação origina um aumento da concentração de imunoglobulinas IgG1 no colostro; no entanto, a ingestão de colostro pelos vitelos não garante protecção contra infecção por *M. bovis* (Calloway et al., 2008).

Existe uma variação elevada em tipos de antigénios e entre estirpes de *Mycoplasma* sp. isoladas a partir de casos clínicos de mastite, artrite e pneumonias de bovinos, o que torna extremamente difícil o desenvolvimento de uma vacina contra mastites por *Mycoplasma* sp. (Rosengarten et al., 1994).

Existem contudo alguns resultados promissores no que respeita a tecnologia de vacinas utilizando DNA recombinante, já utilizada nas vacinas para a pneumonia enzoótica suína, ainda que os estudos de campo apontem para um longo tempo de espera até ao sucesso (Nicholas, Ayling & McAuliffe, 2009). Enquanto não estão comercialmente disponíveis vacinas, as vacinas autógenas, ainda que limitadas a cada exploração em particular, têm constituído uma alternativa eficaz para colmatar a lacuna no curto prazo (Nicholas, Raedelli, Luini, Loria & Ayling, 2008).

As mastites provocadas por *M. bovis* têm uma fraca resposta à antibioterapia, pelo que alguns autores aconselham a segregação e abate das vacas portadoras e o estabelecimento de procedimentos de higiene rígidos como forma de prevenção da disseminação do agente de animais infectados a não infectados (Pfützner, 1990). A identificação de vacas infectadas em fases iniciais de mastite pode ser realizada através da utilização dos testes de ELISA para a detecção de anticorpos no leite de quartos individuais (Byrne et al., 2000) ou através da cultura ou PCR efectuados a partir de amostras de leite de tanque da exploração. Quando uma cultura de leite de tanque é positiva para *Mycoplasma* spp., é necessário identificar os animais potencialmente infectados para recolher amostras adicionais. De uma forma geral,

as vacas com mastites clínicas e as que apresentam contagens de células somáticas mais elevadas deverão ser as primeiras a ser testadas individualmente. Se o grupo das vacas com mastite clínica e contagens de células somáticas elevadas apresenta animais positivos a *Mycoplasma* spp. e se o refugo / isolamento destes animais conduz a resultados negativos de amostras de leite de tanque, pode ser inferido que as vacas com micoplasmose foram identificadas e eliminadas. No caso de serem apenas isoladas, deverão assim permanecer até ao seu refugo e a monitorização do leite de tanque deverá ser continuado de uma forma regular. Se as amostras do tanque continuarem a ser positivas para *Mycoplasma* spp., mesmo após o isolamento das positivas numa primeira etapa, deverão ser constituídos grupos de animais e deverão ser realizadas culturas a partir do leite destes grupos até serem identificadas todas as vacas excretoras do agente, reduzindo assim os custos inerentes aos exames laboratoriais e ao trabalho dispendido na identificação individual, mesmo sabendo que esta abordagem será necessariamente mais demorada (Fox et al., 2005).

Caso a prevalência de *Mycoplasma* spp. seja demasiado elevada para que se consiga refugar / isolar todos os animais de uma só vez, recomenda-se que se refuguem gradualmente as vacas menos produtivas, mantendo as outras em produção até ser possível realizar o seu refugo. Neste caso, é essencial ter cuidados extremos na higiene e manejo da ordenha, nomeadamente desinfecção dos tetos antes da ordenha, utilização de luvas descartáveis durante a ordenha, utilização de toalhetes de assepsia após a ordenha, utilização de “back-flush” entre ordenhas e ordenha das vacas infectadas no final da ordenha (Jasper, 1981; Brown et al., 1990; Kirk & Lauerman, 1994; Pfützner & Sachse, 1996; Rhoda, 2000; Gonzalez & Wilson, 2003). De facto, a melhor forma de controlar as mastites por *Mycoplasma* spp. é o refugo dos animais positivos assim que possível, o isolamento dos positivos mesmo que continuem em produção, a implementação das medidas de higiene descritas, a boa manutenção do material de ordenha (Fox et al., 2005) e a utilização de antibioterapia com eficácia sobre o microorganismo, mesmo que o mesmo não seja totalmente eficaz.

A utilização metafilática de antibióticos é de uma forma geral indesejável (Faculty of Veterinary Medicine of Utrecht, 2003). Contudo o seu uso pode ser justificado quando os vitelos são introduzidos em explorações com uma elevada pressão de infecção de *M. bovis*, de forma a evitar elevados níveis de mortalidade, conforme demonstrado por vários estudos.

A aplicação de espectinomicina durante 3 dias consecutivos mostrou-se eficaz no controlo da progressão da doença clínica em vitelos com 4 semanas de idade inoculados com *M. bovis* (Poumarat et al., 2001). A aplicação metafilática de enrofloxacin 10% (Baytril 100, Bayer) para controlo da DRB em bovinos de engorda nos E.U.A. resultou numa menor incidência de recaídas, de doença crónica e em menor mortalidade nos grupos tratados com enrofloxacin relativamente aos grupos tratados com tulatromicina (Draxxin, Pfizer), tilosina (Micotyl, Elanco) e florfenicol (Nuflor, Schering-Plough) e aos animais não tratados (Hawkins, 2006). A eficácia da enrofloxacin foi confirmada por Froyman et al. (2008), que compararam 3 tratamentos injectáveis de curta duração para o combate de DRB provocada por inoculação experimental de *M. bovis* e *M. haemolytica*: enrofloxacin (Baytril Max, Bayer), florfenicol (Nuflor, Schering-Plough) e cefquinona (Cobactan LA, Intervet), concluindo que o primeiro resultou num menor número de animais com pneumonia e menor crescimento de *M. bovis* comparativamente com os outros 2 grupos, sendo qualquer um dos 3 grupos tratados menos afectado que o grupo controlo não tratado. Quando a administração metafilática de enrofloxacin a 10% é acompanhada por medidas de higiene, é possível reduzir o custo de tratamentos antibióticos na exploração em 50%, diminuído a incidência de DRB e a seropositividade nos animais ao fim de 1 ano (Gevaert & Passchyn, 2008).

O controlo das pneumonias em vitelos deverá incluir medidas que visem reduzir o *stress* ambiental e assegurar uma boa circulação de ar nas instalações. Sempre que possível, deverá ser considerada a estratégia de manejo “tudo dentro, tudo fora” de forma a evitar a infecção de animais jovens a partir de animais mais velhos. Se tal não se revelar possível, é aconselhável efectuar a separação de vitelos dos adultos o mais cedo possível, consoante as condições de manejo o permita (Nicholas & Ayling, 2003).

2) Prevalência de *Mycoplasma bovis* em 3 OPP Portuguesas: estudo sero-epidemiológico

2.1) Introdução

Em bovinos, além de *Mycoplasma mycoides subspecies mycoides* SC, presente em África e algumas regiões da Ásia, *M. bovis* é a espécie mais patogénica do género *Mycoplasma*, sendo responsável por pneumonias, mastites, artrites, queratoconjuntivites, otites e infertilidade (Nicholas & Ayling, 2003; Stipkovits & Szathmary, 2008). A infecção surge em explorações indemnes através da introdução de animais infectados assintomáticos, fomites, leite ou sêmen de animais infectados (Stipkovits & Szathmary, 2008). Os sinais clínicos da infecção respiratória em animais jovens incluem descarga nasal purulenta, tosse, dispneia, temperatura rectal aumentada e apatia, podendo 20% dos animais do grupo desenvolver artrite uni / bilateral ou otite (Stipkovits & Szathmary, 2008). Caso não seja efectuado tratamento, a mortalidade pode atingir 25-30% dos animais durante os primeiros 40 dias, sendo esta condicionada pelo sinergismo com outros agentes patogénicos de DRB como *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* ou BVDV (Shahriar et al., 2002; Gagea et al., 2006b). Os animais que recuperam da infecção podem permanecer portadores, sendo sempre potenciais reservatórios do microorganismo, podendo o seu peso aos 8 a 10 meses ser 100 kg inferior ao de animais não infectados, (Stipkovits & Szathmary, 2008). Em vacas gestantes, a infecção pode resultar em aborto ou parto prematuro de vitelos com pneumonia e artrite, apresentando 50% das vacas infectadas retenção placentária e tendência para o desenvolvimento de mastites no pós-parto (Stipkovits & Szathmary, 2008). Vitelos alimentados com leite de vacas com mastite provocada por *M. bovis* desenvolvem sintomas respiratórios em 3-6 dias, resultando em inflamação da traqueia, pleurite e pneumonia catarral de extensão variável, linfonodos peribronquicos edemaciados, e acumulação de exsudados na cápsula articular caso existam artrites (Stipkovits & Szathmary, 2008). Em vacas com mastites provocadas por *M. bovis*, a principal fonte de infecção de animais saudáveis é a introdução de animais infectados na exploração e contágio durante a ordenha, podendo também ocorrer por via hematogénica ou linfática a partir de outros locais do organismo como vias respiratórias ou articulações (Fox, Schneider & Stipkovits, 2008).

Ainda que seja um microorganismo subestimado (Nicholas & Ayling, 2003), o impacto económico de *M. bovis* é apontado como elevado na indústria da carne e do leite, estimando-se que nos E.U.A. os custos associados a *M. bovis* em 140 milhões de dólares (Rosengarten & Citti, 1999). O diagnóstico através de métodos microbiológicos, serológicos ou moleculares é capital para o conhecimento do envolvimento do agente em cada zona geográfica e exploração, bem como no processo de doença em causa (Nicholas & Baker, 1998).

A prevalência de anticorpos anti-*Mycoplasma bovis* tem sido referida em vários países como indicadora da presença do agente nas explorações bovinas (Ghadersohi et al., 1999; Nicholas & Ayling, 2003) e como uma forma expedita de avaliar a extensão de animais infectados por esta bactéria. Paralelamente, vários autores referem o isolamento do agente em explorações com surtos de pneumonia ou otite (ter Laak et al., 1992b; Byrne, McCormack, Brice, Markey & Ball, 2001; Le Grand, Phillippe, Cavavalas, Bezille & Poumarat, 2001; Tschopp, Bonnemain, Nicolet & Burnens, 2001; Maeda et al., 2003; Radaelli et al., 2008) ou surtos de mastite (Fox et al., 2003; Gonzalez & Wilson, 2003; Arcangioli et al., 2008). Em Portugal, Pinho et al. (2008) referem a ocorrência de um surto de *M. bovis* numa exploração leiteira de EDM e Atalaia (1983), Machado & Atalaia (1987), Gonçalves (1990), Antunes et al. (2008) e Preto (comunicação pessoal, Abril de 2008) referem o isolamento de *M. bovis* nalgumas regiões do país, estando em curso um estudo de prevalência de *M. bovis* em tanques de leite nas explorações de EDM (Pinho et al., comunicação pessoal, 2009, dados não publicados).

A quimioterapia tem-se revelado eficaz no combate do agente (Stipkovits et al., 2001; Froyman & Perzo, 2005; Nicholas et al., 2006; Gevaert & Passchyn, 2008), contudo, o desenvolvimento de resistências e uso controverso de antimicrobianos em animais de consumo humano alertam para a necessidade do desenvolvimento de vacinas comerciais eficazes, cujo aparecimento parece ainda longínquo (Ayling et al., 2000; Nicholas et al., 2008).

O controlo do agente inclui medidas de maneio que minimizem o seu impacto na produção de carne e de leite, recorrendo a antibioterapia como última opção (Fox et al., 2003; Nicholas & Ayling, 2003), sendo por isso fundamental o conhecimento da epidemiologia de *M. bovis* nas explorações bovinas portuguesas. O objectivo do presente trabalho é neste sentido conhecer a extensão do contacto de bovinos com o agente, e se possível fornecer indicações sobre a sua epidemiologia nas explorações portuguesas.

2.2) Materiais e métodos

2.2.1) Área e população em estudo

O presente estudo foi realizado em 3 OPP de Portugal continental: OPP de Vila do Conde, OPP de Acripinhal e OPP do Campo Branco.

Segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE) (2008), em 2007 existiam em Portugal 1 443 000 bovinos, dos quais 306 000 eram vacas leiteiras (Tabela 6). O Norte do país continha 36,6% das vacas leiteiras e 48,1% dos vitelos de carne, o Centro continha 20,8% dos vitelos de carne e o Alentejo continha 50% dos bovinos não leiteiros.

Tabela 6. Efectivos bovinos em Portugal em 2007, por NUTS II (nomenclatura comum das unidades territoriais estatísticas) (Adaptado de INE, 2008).

NUTS II	Total Bovinos		Vacas Leiteiras		Outros Bovinos		Vitelos de Carne	
	Nº cabeças (x1000)	%	Nº cabeças (x1000)	%	Nº cabeças (x1000)	%	Nº cabeças (x1000)	%
Portugal	1.443	100,00%	306	100,00%	1.137	100,00%	88	100,00%
Continente	1.199	83,10%	206	67,30%	993	87,30%	76	87,00%
Norte	334	23,10%	112	36,60%	222	19,50%	42	48,10%
Centro	211	14,60%	60	19,60%	151	13,30%	18	20,80%
Lisboa	51	3,50%	9	2,90%	42	3,70%	3	3,20%
Alentejo	593	41,10%	24	7,80%	569	50,00%	11	12,30%
Algarve	10	0,70%		0,00%	10	0,90%	2	2,50%
Açores	240	16,60%	99	32,40%	141	12,40%	11	12,40%
Madeira	4	0,30%	1	0,30%	3	0,30%	1	0,60%

Com base nestes dados, foram seleccionadas 3 áreas geográficas em que a aptidão e maneios das explorações fossem características das diversas formas existentes em Portugal Continental: 1 do Norte, 1 do Centro e 1 do Sul. A selecção das referidas OPP dependeu da disponibilidade de recursos logísticos para recolha de amostras e com o facto de a primeira representar maioritariamente bovinos de vocação leiteira criados em regime intensivo, a segunda bovinos de engorda criados em regime intensivo e a terceira bovinos de carne criados em regime extensivo.

A OPP de Vila do Conde engloba 30 freguesias, onde estão registados 33 695 animais distribuídos por 587 explorações (programa informático de sanidade animal (PISA), Fevereiro de 2008); a OPP de Acripinhal engloba 5 freguesias onde estão registados 576 bovinos de carne criados em regime intensivo, distribuídos por 3

explorações de engorda (Acripinhal, Fevereiro de 2008) e a OPP de Campo Branco engloba 31 freguesias onde estão registados 21 402 animais distribuídos por 381 explorações (PISA, Fevereiro de 2008).

2.2.2) Amostragem de explorações

A unidade epidemiológica em estudo foi a exploração de bovinos, pretendendo-se determinar a prevalência de explorações positivas a anticorpos anti-*Mycoplasma bovis* nas 3 OPP envolvidas no estudo, bem como a prevalência do número de animais com anticorpos anti-*Mycoplasma bovis* dentro de cada exploração. Na impossibilidade de testar todas as explorações de cada OPP e todos os animais dentro de cada exploração, foi efectuada uma amostragem aleatória simples em duas fases: ao nível das explorações de cada OPP e dentro de cada exploração seleccionada.

Na primeira fase foi calculado o tamanho da amostra para obter determinar a prevalência na população de explorações de bovinos em estudo para cada OPP.

Este foi calculado com base no número total de explorações de bovinos da população em estudo em cada OPP (sistema nacional de identificação e registo de bovinos (SNIRB), 2008): 587 explorações na OPP de Vila do Conde, 3 explorações na OPP de Acripinhal e 381 explorações na OPP de Campo Branco. Foi assumido um valor de prevalência esperada (P) de 50%, devido à ausência de dados relativos a estudos epidemiológicos sobre este microorganismo e sobre a prevalência de anticorpos contra o mesmo. O erro absoluto (L) assumido foi de 10%, e o número mínimo da amostra foi calculado para um nível de confiança (α) de 90%. Estes valores foram introduzidos num programa de cálculo de amostras para estimar a percentagem de doença (Winepiscope 2.0) e o número mínimo de unidades epidemiológicas (explorações de bovinos) a ser testadas foi de: 61 explorações na OPP de Vila do Conde, 3 explorações na OPP de Acripinhal e 58 explorações para a OPP de Campo Branco.

Com base na listagem de explorações incluídas na população inicial em estudo (PISA, Janeiro de 2008 e OPP de Acripinhal, Janeiro de 2008), foi para cada OPP realizada uma amostragem aleatória simples, com o auxílio do programa Microsoft Excel 2003.

2.2.3) Amostragem intra - exploração

Numa segunda fase, para cada exploração seleccionada, consoante o número total de animais dessa exploração, foi calculado o tamanho da amostra necessária para determinar a prevalência de animais sero-positivos dentro de cada exploração. Foi utilizada nesta segunda fase de amostragem a mesma metodologia descrita para a fase anterior ($P=50\%$, $L=10\%$ e $\alpha=95\%$, através do programa Winepiscopes 2.0). Os animais representativos da amostra mínima intra-exploração foram seleccionados através de uma amostragem aleatória simples (Microsoft Excel 2003).

As listas de explorações seleccionadas bem como o número de amostras dentro de cada exploração foram enviadas aos respectivos médicos veterinários responsáveis de cada OPP, que colaboraram na coordenação da recolha de amostras, tendo sido seleccionados os animais necessário através de amostragem aleatória sistemática.

2.2.4) Elaboração de questionários de exploração

Foi elaborado um questionário para preenchimento pelo médico veterinário responsável por cada exploração de bovinos seleccionada para recolha de amostras de soro sanguíneo. Os questionários tiveram como objectivo a recolha de dados referentes ao tipo de exploração e respectivo manejo, nomeadamente a existência de contacto dos bovinos com outras espécies ou com outras explorações, modo de compra e introdução de novos animais e história vacinal e clínica da exploração. O modelo do questionário implementado está incluído no Anexo 1 do presente trabalho.

2.2.5) Recolha de amostras

Nas explorações aleatoriamente seleccionadas foram recolhidas amostras de sangue aos animais, seleccionados através de amostragem aleatória sistemática, para efectuar a pesquisa individual de anticorpos anti-*Mycoplasma bovis*.

As amostras de sangue foram colhidas para tubos de vidro ou plástico estéreis sem anticoagulante (figura 1.), mantidas refrigeradas a 4 °C e enviados para o Laboratório de Sanidade Animal da Agros no caso das amostras provenientes da OPP de Vila do Conde, para o Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FMV-UTL no caso das amostras da OPP de Acripinhal ou para o Laboratório Veterinário do Litoral Alentejano no caso das amostras da OPP de Campo Branco. As amostras

foram centrifugadas e o soro obtido foi separado do coágulo e transferido para microtubos estéreis. Estes soros foram congelados a -20°C e transportados até ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FMV-UTL, onde foram realizados os testes de ELISA.



Figura 1. Tubos de plástico estéreis, utilizados na recolha de amostras sanguíneas individuais.

2.2.6) Processamento de amostras

Foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FMV-UTL 1930 amostras da OPP de Vila do Conde, 136 amostras da OPP de Acripinhal e 1525 amostras da OPP de Campo Branco. As amostras foram armazenadas a -20°C , descongeladas a 4°C e testadas por um método de ELISA indirecto disponível comercialmente (Bio-X *Mycoplasma bovis* Elisa Kit: Bio K 260).

2.2.6.1) Fundamentos do teste de ELISA

Foi utilizado o kit comercial Bio-X *Mycoplasma bovis* Elisa Kit: Bio K 260, com factor kappa (K) de 75% (Bio-X, 2008). Os poços de microtitulação são revestidos por uma proteína recombinante de *Mycoplasma bovis* expressa em *E. coli*. As colunas ímpares (1, 3, 5, 7, 9 e 11) contêm a proteína recombinante e as colunas pares (2, 4, 6, 8, 10 e 12) contêm um antígeno que funciona como controlo negativo. Deste modo o teste tem um controlo negativo que permite diferenciar os anticorpos específicos anti-*Mycoplasma bovis*. A utilização deste controlo permite reduzir consideravelmente o número de falsos positivos. Cada placa permite a análise de 47 amostras, sendo cada uma testada em duplicado (poço positivo e poço negativo), para além de conter 1 amostra de soro positivo fornecido com o kit comercial. O conjugado utilizado é proteína G marcada com peroxidase, e o cromogénio é tetrametilbenzidina (TMB). A TMB tem a vantagem de ser mais sensível que outros cromogénios ao mesmo tempo que não é carcinogénico. A reacção positiva é revelada pelo desenvolvimento de cor, e a intensidade da reacção é directamente

proporcional ao título de anticorpos específicos para *Mycoplasma bovis* presente na amostra. O valor de densidade óptica do poço negativo é subtraído ao valor da densidade óptica do poço positivo do mesmo soro, sendo desta forma possível quantificar a reacção de um soro desconhecido numa escala de 0 a 4 (Bio-X *Mycoplasma bovis* Elisa Kit: Bio K 260) (figura 2).



Figura 2. Bio-X *Mycoplasma bovis* Elisa Kit: Bio K 260.

2.2.6.2) Procedimento experimental

No Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FMV-UTL, o método de ELISA foi efectuado em 16 passos:

- 1) identificação interna dos soros;
- 2) descongelação dos soros em gelo ou a 4 °C;
- 3) colocação dos reagentes do *kit* comercial à temperatura ambiente 30 minutos antes do início do procedimento experimental;
- 4) diluição de 10 µl de soro em 1ml de tampão de diluição em eppendorfs de 2ml. Procedimento igual para o soro positivo fornecido com o *kit* comercial;
- 5) distribuição de 100 µl de soro diluído 1:100 em cada poço, da seguinte forma: soro positivo nos poços A1 e A2, amostra 1 nos poços B1 e B2, amostra 2 nos poços DC1 e C2, amostra 3 nos poços D1 e D2 e assim sucessivamente (47 amostras por placa);
- 6) incubação da placa a 37 °C durante 1 hora;
- 7) registo em folha interna das referências internas dos soros a colocar em cada poço;
- 8) lavagem da placa 3 vezes com a solução de lavagem incluída no kit comercial (Labystems Wellwash 4 MK2);
- 9) distribuição de 100 µl de conjugado previamente preparado em cada poço (250µl de conjugado diluído em 12,250 ml do tampão de diluição) (figura 3.);

- 10) incubação da placa a 37 °C durante 1 hora;
- 11) lavagem da placa 3 vezes com a solução de lavagem incluída no kit comercial (Labsystems Wellwash 4 MK2);
- 12) distribuição de 100 µl da mistura de substrato e cromogénio em cada poço (9,5 ml de H₂O₂ e 12 gotas de TMB);
- 13) Incubação da placa durante 10 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz;
- 14) distribuição de 50 µl de uma solução contendo um ácido fosfórico (1M) disponível no kit comercial, em cada poço;
- 15) leitura imediata das densidades ópticas (DO) da placa de ELISA num espectrofotómetro com um comprimento de onda de 450 nm (iEMS Reader);
- 16) gravação dos resultados no software ASCENT do computador ligado ao aparelho que permite realizar as incubações e leitura das DO das placas.



Figura 3. Distribuição de conjugado em cada poço, recorrendo a pipeta multicanal.

2.2.6.3) Cálculo dos resultados

A partir dos resultados das DO a 450 nm, foram realizados os cálculos para validação e interpretação dos resultados de ELISA.

Apenas foram considerados válidas as placas cuja DO lidas no poço ímpar do soro positivo foi superior ao valor fornecido no QC (controlo de qualidade) do kit comercial.

O resultado da leitura da DO no poço par (poço A2) foi subtraído ao resultado da leitura da DO do poço ímpar revestido pelo antigénio bacteriano (poço A1) para o soro positivo fornecido no kit comercial. Para cada amostra de soro foi subtraído o valor da DO do poço par ao valor de DO do poço ímpar (B1-B2, C1-C2, D1-D2 e assim sucessivamente). De seguida, o valor obtido para cada amostra foi dividido pela diferença obtida nos poços do soro positivo (A1-A2) e o resultado foi

multiplicado por 100, de forma a ser expresso em percentagem. Utilizando a tabela do procedimento do QC fornecido no kit comercial, os valores em percentagem foram transformados em grau de positividade (de 0 a 4). Tendo apenas sido utilizado um lote de *kits* comerciais, os valores do controlo de qualidade foram os mesmos em todas as amostras testadas: valores inferiores a 12,10 corresponderam resultado 0 (negativo), valores entre 12,10 e 44,44 corresponderam a resultado 1, valores entre 44,44 e 76,78 corresponderam a resultado 2, valores entre 76,78 e 109,12 corresponderam a resultado 3 e valores superiores a 109,12 corresponderam a resultado 4.

2.2.7) Análise dos resultados

Todos os resultados obtidos nos testes de ELISA foram introduzidos em bases de dados Microsoft Excel 2003, para posterior análise estatística descritiva. Com base nos resultados obtidos, foi efectuada, para cada uma das OPP em estudo, uma estimativa da prevalência de explorações com animais seropositivos para *Mycoplasma bovis*, bem como do número de animais seropositivos em cada uma destas explorações.

As respostas aos questionários foram igualmente introduzidas em bases de dados (Microsoft Excel 2003), para posterior análise estatística descritiva e cruzamento de dados com os resultados laboratoriais obtidos.

As bases de dados com os resultados serológicos e com os inquéritos foram exportadas para o programa SPSS (SPSS, 2009), tendo sido efectuada uma análise descritiva dos dados, seguindo-se o teste de hipóteses, pelo Teste de Kruskal Wallis, teste exacto de Fischer e teste de Mann-Whitney U.

2.3) Resultados

2.3.1) Caracterização das explorações em estudo

Em função dos dados inseridos no SNIRB, foi possível realizar uma caracterização sumária das explorações amostradas no estudo.

A caracterização das explorações em estudo foi efectuada através do **número de bovinos inscritos no SNIRB por exploração**. Na OPP de Vila do Conde os valores

para esta variável oscilaram entre 2 e 212, com mediana de 67, uma média de 77,1 animais e um desvio padrão de 53,1. Na OPP de Acripinhal os valores para esta variável oscilaram entre 87 e 350, com uma mediana de 139, uma média de 192,0 animais e um desvio padrão de 139,3. Na OPP de Campo Branco os valores para esta variável oscilaram entre 2 e 174, com uma média de 45,5 animais e um desvio padrão de 39,8.

Os valores obtidos numa análise estatística descritiva efectuada sobre os dados, agrupados por OPP de origem, são apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Análise estatística descritiva do número de bovinos por exploração amostrada, agrupados pelas OPP de origem.

	Vila do Conde	Acripinhal	Campo Branco
Nº Explorações	61	3	59
Total de animais	4703	576	2685
Mínimo	2	87	2
Máximo	212	350	174
Média	77,1	192	45,5
Mediana	67,0	139,0	38,0
Desvio Padrão	53,1	139,3	39,8

Comparando o número de animais por exploração em cada OPP, através do teste de Kruskal Wallis, existem diferenças entre os 3 OPP no que diz respeito ao tamanho das explorações amostradas ($p < 0,01$) (Anexo 3), existindo efectivos de maior dimensão na OPP de Acripinhal (mediana de 139 animais), seguido da OPP de Vila do Conde (mediana de 67 animais) e OPP de Campo Branco (mediana de 38 animais).

2.3.2) Número de amostras individuais recolhidas por exploração

Em função dos dados inseridos no Winepiscope 2.0 (ver Materiais e Métodos), foi possível realizar uma caracterização sumária das amostras individuais recolhidas por exploração.

O número de amostras individuais recolhidas por exploração foi quantificado pelo **número de bovinos com recolha de sangue individual por exploração**. Na OPP de Vila do Conde os valores para esta variável oscilaram entre 2 e 57, com uma mediana de 36, uma média de 31,6 animais e um desvio padrão de 14,4. Na OPP de

Acripinhal os valores para esta variável oscilaram entre 32 e 57, com uma mediana de 47, uma média de 45,3 animais e um desvio padrão de 44,5. Na OPP de Campo Branco os valores para esta variável oscilaram entre 2 e 60, com uma mediana de 27, uma média de 25,8 animais e um desvio padrão de 14.

Os valores obtidos numa análise estatística descritiva efectuada sobre os dados, agrupados por OPP de origem, são apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Análise estatística descritiva do número de bovinos com recolha de sangue individual por exploração amostrada, agrupados pelas OPP de origem.

	Vila do Conde	Acripinhal	Campo Branco
Nº Explorações	61	3	59
Soma animais	1930	136	1525
Mínimo	2	32	2
Máximo	57	57	60
Média	31,6	45,3	25,8
Mediana	36,0	47,0	27,0
Desvio Padrão	14,4	12,6	14,0

O número de amostras recolhidas por exploração foi significativamente diferente ($p=0,012$) entre OPP, de acordo com o teste de Kruskal Wallis (Anexo 3).

2.3.3) Resultados dos testes de ELISA

2.3.3.1) Prevalência de explorações positivas a anticorpos anti-*Mycoplasma bovis*

Os resultados dos testes de ELISA efectuados para detecção de anticorpos anti-*Mycoplasma bovis* indicam uma prevalência de 98% ($n=60$), 100% ($n=3$) e 98% ($n=58$) de explorações positivas (com pelo menos um animal positivo) nas OPP de Vila do Conde, Acripinhal e Campo Branco, respectivamente (tabela 9).

Tabela 9. Prevalência de Explorações positivas na OPP de Vila do Conde, Acripinhal e Campo Branco.

	Positivas	Negativas	Total
Vila do Conde	60 (98%)	1 (2%)	61 (100%)
Acripinhal	3 (100%)	0 (0%)	3 (100%)
Campo Branco	58 (98%)	1 (2%)	59 (100%)

2.3.3.2) Prevalência Intra-Exploração de anticorpos anti-*Mycoplasma bovis*

Em função dos resultados semi-quantitativos dos testes de ELISA efectuados (grau 0 a 4, sendo 0 negativo), foi possível realizar uma caracterização das amostras individuais recolhidas por exploração em cada OPP.

A prevalência intra-exploração de anticorpos anti-*Mycoplasma bovis* foi quantificada pelo **resultado semi-quantitativo dos testes individuais por exploração**.

Na OPP de Vila do Conde foram identificados 988 animais positivos (grau 1 a 4) e 942 negativos (grau 0). A mediana de animais positivos por exploração foi de 14, com uma variação entre 0 e 45, uma média de 16,2 animais e um desvio padrão de 10,8. A mediana de animais negativos por exploração foi de 15,5, com uma variação entre 1 e 38, uma média de 16,2 animais e um desvio padrão de 8,5 (tabela 10).

Tabela 10. Resultados semi-quantitativos dos testes individuais por exploração, na OPP de Vila do Conde.

Vila do Conde	1	2	3	4	Positivo	Negativo	Total
Somatório	857	117	12	2	988	942	1930
Mediana	13,0	2,0	1,0	1,0	14,0	15,5	36,0
Mínimo	1	1	1	1	0	1	2
Máximo	39	13	2	1	45	38	57
Média	14,3	2,7	1,2	1,0	16,2	16,2	31,6
Desvio Padrão	9,3	2,7	0,4	0,0	10,7	8,5	14,4

Em termos percentuais, na mesma OPP, a mediana de animais positivos por exploração foi de 50,0%, dos quais as medianas de animais com grau 1, 2, 3 e 4 foram de 90,5%, 8,0%, 0,0% e 0,0% respectivamente (tabela 11).

Tabela 11. Resultados percentuais, por exploração, na OPP de Vila do Conde.

Vila do Conde	% Positivos	% Negativos	% de 1	% de 2	% de 3	% de 4
Mediana	50,0%	50,0%	90,5%	8,0%	0,0%	0,0%
Mínimo	0,0%	0,0%	25,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Máximo	100,0%	100,0%	100,0%	50,0%	50,0%	11,1%
Média	50,7%	49,3%	86,6%	11,1%	2,1%	0,2%
Desvio Padrão	22,8%	22,8%	16,0%	12,7%	7,6%	1,5%

Na OPP de Acripinhal foram identificados 110 animais positivos (grau 1 a 4) e 26 negativos (grau 0). A mediana de animais positivos por exploração foi de 40, com uma variação entre 29 e 41, uma média de 36,7 animais e um desvio padrão de 6,7. A mediana de animais negativos por exploração foi de 7, com uma variação entre 3 e 16, uma média de 8,7 animais e um desvio padrão de 6,7 (tabela 12).

Tabela 12. Resultados semi-quantitativos dos testes individuais por exploração, na OPP de Acripinhal.

Acripinhal	1	2	3	4	Positivo	Negativo	Total
Somatório	66	29	12	3	110	26	136
Mediana	24,0	12,0	6,0	3,0	40,0	7,0	47,0
Mínimo	16	3	3	3	29	3	32
Máximo	26	14	9	3	41	16	57
Média	22,0	9,7	6,0	3,0	36,7	8,7	45,3
Desvio Padrão	5,3	5,9	4,2	—	6,7	6,7	12,6

Em termos percentuais, na mesma OPP, a mediana de animais positivos por exploração foi de 85,0%, dos quais as medianas de animais com grau 1, 2, 3 e 4 foram de 59,0%, 30,0%, 7,0% e 0,0% respectivamente (tabela 13).

Tabela 13. Resultados percentuais, por exploração, na OPP de Acripinhal.

Acripinhal	% Positivos	% Negativos	% de 1	% de 2	% de 3	% de 4
Mediana	85,1%	14,9%	58,5%	30,0%	7,3%	0,0%
Mínimo	71,9%	9,4%	40,0%	10,3%	0,0%	0,0%
Máximo	90,6%	28,1%	89,7%	34,1%	22,5%	7,5%
Média	76,4%	23,6%	59,3%	30,3%	9,1%	1,4%
Desvio Padrão	6,3%	6,3%	1,0%	5,5%	2,5%	1,9%

Na OPP de Campo Branco foram identificados 1059 animais positivos (grau 1 a 4) e 466 negativos (grau 0). A mediana de animais positivos por exploração foi de 17, com uma variação entre 0 e 54, uma média de 17,9 animais e um desvio padrão de 11,5. A mediana de animais negativos por exploração foi de 6, com uma variação entre 1 e 30, uma média de 8,5 animais e um desvio padrão de 6,6 (tabela 14).

Tabela 14 - Resultados semi-quantitativos dos testes individuais por exploração, na OPP de Campo Branco.

Campo Branco	1	2	3	4	Positivo	Negativo	Total
Somatório	928	114	10	7	1059	466	1525
Mediana	14,0	2,0	1,0	1,0	17,0	6,0	27,0
Mínimo	1	1	1	1	0	1	2
Máximo	47	7	3	4	54	30	60
Média	16,0	2,7	1,3	1,8	17,9	8,5	25,8
Desvio Padrão	10,0	1,7	0,7	1,3	11,5	6,6	14,0

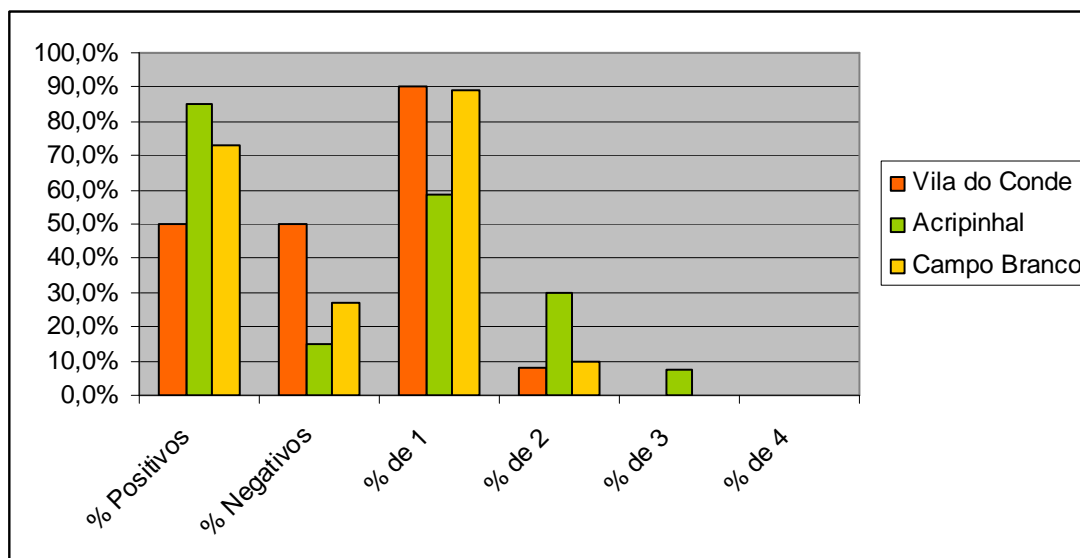
Em termos percentuais, na OPP de Campo Branco, a mediana de animais positivos por exploração foi de 72,7%, dos quais as medianas de animais com grau 1, 2, 3 e 4 foram de 89,2%, 10,0%, 0,0% e 0,0% respectivamente (tabela 15).

Tabela 15. Resultados percentuais, por exploração, na OPP de Campo Branco.

Campo Branco	% Positivos	% Negativos	% de 1	% de 2	% de 3	% de 4
Mediana	72,7%	27,3%	89,2%	10,0%	0,0%	0,0%
Mínimo	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Máximo	100,0%	100,0%	100,0%	50,0%	15,4%	50,0%
Média	69,4%	30,6%	87,6%	10,0%	1,0%	1,5%
Desvio Padrão	20,4%	20,4%	14,9%	9,3%	2,7%	7,0%

Comparando as prevalências intra-exploração por OPP através do Teste de Mann-Whitney U, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre a OPP de Vila do Conde e Acripinhal ($p=0,017$) e entre Vila do Conde e Campo Branco ($p<0,001$), não existindo diferença estatística entre Acripinhal e Campo Branco ($p>0,05$) (Anexo 3). De acordo com o mesmo teste, não foi verificada diferença estatística entre a percentagem animais com grau 1, 2, 3 ou 4 entre as 3 OPP ($p>0,05$) (Anexo 3). O gráfico 1 apresenta a mediana da percentagem de animais positivos por exploração nas 3 OPP.

Gráfico 1. Mediana da percentagem de animais animais positivos e negativos por exploração, e da percentagem de diferentes classes de positivos, nas 3 OPP.



2.3.4) Resultados dos inquéritos epidemiológicos

Foram realizados 61 inquéritos na OPP de Vila do Conde, 3 na OPP de Acripinhal e 53 na OPP de Campo Branco.

O tipo e regime das explorações em estudo variavam consoante a OPP a que pertenciam (tabela 16). Na OPP de Vila do Conde 85% (n=52) das explorações inquiridas são de vocação leiteira e regime intensivo, 13% (n=8) são engordas de regime intensivo e 2% (n=1) correspondem a explorações de bovinos de carne em regime extensivo. Na OPP de Acripinhal a totalidade (n=3) das explorações inquiridas corresponde a bovinos de engorda em regime intensivo e na OPP de Campo Branco a totalidade (n=53) das explorações inquiridas são explorações de bovinos carne criados em regime extensivo.

Tabela 16 . Tipo e regime das explorações inquiridas, por OPP.

OPP	Bovinos Leiteiros / Intensivo	Bovinos de Carne / Extensivo	Bovinos de Engorda / Intensivo	Total
Vila do Conde	52	1	8	61
Acripinhal	-	-	3	3
Campo Branco		53	-	53

Na OPP de Vila do Conde (n=0) nenhuma das explorações inquiridas tem bovinos em contacto com bovinos de outras explorações, em Acripinhal 67% (n=2) têm contacto com bovinos de outras explorações e na OPP de Castro verde apenas 9% (n=5) das explorações inquiridas tem contacto com bovinos de outras explorações (tabela 17).

Tabela 17. Existência de contacto com bovinos de outras explorações, por OPP.

OPP	Não	Sim	Total
Vila do Conde	61	-	61
Acripinhal	1	2	3
Campo Branco	48	5	53

No que respeita a existência e contacto de outras espécies pecuárias nas explorações inquiridas, na OPP de Vila do Conde apenas 2% (n=1) das explorações tem outras espécies pecuárias na exploração, 100% (n=3) das explorações de Acripinhal tem outras espécies pecuárias na exploração, enquanto 81% (n=43) das explorações de Campo Branco tem outras espécies pecuárias na exploração (tabela 18).

Tabela 18. Existência de contacto com outras espécies pecuárias na exploração, por OPP.

OPP	Não	Sim	Total
Vila do Conde	60	1	61
Acripinhal	-	3	3
Campo Branco	10	43	53

Relativamente à reposição de animais, 85% (n=52), 0% (n=0) e 92% das explorações inquiridas realizam reposição com animais nascidos na própria exploração, nas OPP de Vila do Conde, Acripinhal e Campo Branco, respectivamente (tabela 19), não existindo diferenças estatisticamente significativas entre as OPP de Vila do Conde e Campo Branco, segundo o teste exacto de Fisher (Anexo 3).

Tabela 19. Reposição de animais realizada com animais nascidos na exploração, por OPP.

OPP	Não	Sim	Total
Vila do Conde	9	52	61
Acipinhal	3	-	3
Campo Branco	4	49	53

No que respeita a compra de animais, nas OPP de Vila do Conde, Acipinhal e Campo Branco, 59% (n=36), 100% (n=3) e 9% (n=5) das explorações compram animais (tabela 20).

Tabela 20. Explorações que compram animais, por OPP.

OPP	Não	Sim	Total
Vila do Conde	25	36	61
Acipinhal	-	3	3
Campo Branco	48	5	53

O local de compra é variável nas 3 OPP, sendo que em Vila do Conde 11% (n=7) adquire em Mercados / Feiras, 16% (n=10) em negociantes, 30% recorre a importação (n=18) e 43% (n=26) a outra fonte. Na OPP de Acipinhal 67% (n=2) recorre à compra através de negociantes e 33% (n=1) a outra forma. Na OPP de Campo Branco, apenas 2% (n=1) recorre a importação, sendo que 98% (n=52) das explorações inquiridas recorre a outra forma de compra de animais, nomeadamente a outras explorações próximas (tabela 21).

Tabela 21. Local de compra de animais, por OPP.

OPP	Mercados / Feiras	Negociantes	Importação	Outra	Total
Vila do Conde	7	10	18	26	61
Acipinhal	-	2	-	1	3
Campo Branco	-	-	1	52	53

No que respeita a vacinação de animais por exploração (tabela 22), na OPP de Vila do Conde 56% (n=34) das explorações inquiridas não aplica qualquer vacina, e 44% (n=27) realiza vacinação contra BVDV/ vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina

(IBRV) ou BVDV/IBRV/ PI3V / vírus respiratório sincial bovino (BRSV). Na OPP de Acripinhal é realizada vacinação contra a enterotoxémia em 100% (n=3) das explorações inquiridas. Na OPP de Campo Branco 96% (n=51) das explorações realiza vacinação contra a enterotoxémia e 4% (n=2) contra enterotoxémia e BVDV/IBRV/PI3V/BRSV.

Tabela 22. Vacinação em cada exploração, por OPP.

OPP	Não aplica vacina	BVDV/IBRV ou BVDV/IBRV/PI3V/BRSV	Enterotoxémia	Enterotoxémia + BVDV/IBRV/PI3V/BRSV	Total
Vila do Conde	34	27			61
Acripinhal			3		3
Campo Branco			51	2	53

Devido à ausência de registos credíveis sobre a história clínica das explorações no passado recente, em todas as OPP, não foi possível considerar esta variável na apresentação dos resultados dos inquéritos epidemiológicos.

2.4) Discussão

No presente estudo foi efectuada uma pesquisa de prevalência de anticorpos contra *Mycoplasma bovis* em 3 OPP portuguesas com vocações produtivas distintas, recorrendo-se a um método comercial de ELISA. Paralelamente, nas explorações amostradas foram realizados inquéritos epidemiológicos com o objectivo de caracterizar as referidas explorações e identificar eventuais factores de risco para a existência de anticorpos contra o agente, tendo sido encontrada uma elevada prevalência de explorações com anticorpos e uma elevada prevalência de animais positivos por exploração.

Os resultados permitem obter uma estimativa da prevalência de explorações afectadas; no entanto, esta diz apenas respeito ao momento da colheita de amostras. Tendo recorrido ao PISA para contabilização de explorações e animais por OPP, apenas entraram em estudo os animais com mais de 6 meses de idade, uma vez que animais mais jovens não constam da base de dados atrás referida, não sendo por isso sido incluídos no processo de amostragem sistemática. Este facto inviabilizou a possibilidade de relacionar a presença de anticorpos anti-*M. bovis* com

a faixa etária dos animais. Na interpretação do estudo, é igualmente importante realçar que a presença de anticorpos não é indicadora de infecção activa, mas apenas de infecção prévia (até 300 dias antes) ou fase inicial de infecção (Nicholas & Ayling, 2003; Gevaert, 2006).

Desconhecemos à data, a publicação de estudos sobre a prevalência de *M. bovis* ou anticorpos específicos para o agente em Portugal. No entanto, Pinho et al. (comunicação pessoal, 2009, dados não publicados) estão em fase de conclusão de um estudo de prevalência de *M. bovis* no leite de tanque das explorações de Entre-Douro e Minho, com resultados que apontam para uma prevalência de 3% (n=5) de explorações com o agente no leite de tanque.

O estudo por nós efectuado, demonstrou que através de uma boa coordenação logística e cooperação entre entidades, é possível recolher um elevado número de amostras num curto espaço de tempo, podendo inclusivamente a metodologia ser alargada a outras pesquisas serológicas, além de *M. bovis*.

A escolha das 3 OPP (Vila do Conde, Acripinhal e Campo Branco) esteve relacionada com 2 factores. Em primeiro lugar, a procura de áreas geográficas bem definidas que representassem as diferentes realidades da produção de bovinos em Portugal: bovinos de leite, engordas e bovinos de carne; tipicamente situados no norte, centro e sul do país, respectivamente. Em segundo lugar, pelo apoio logístico na recolha e armazenamento de amostras disponibilizado pelos médicos-veterinários e laboratórios de apoio de cada OPP, sem os quais não seria possível a concretização do projecto.

Sendo uma primeira abordagem à presença e epidemiologia de *M. bovis* em Portugal, o objectivo do estudo foi fornecer uma primeira fotografia, ainda que estática e esbatida, no sentido de dar um passo no estudo da epidemiologia de *M. bovis* no nosso país. Assim sendo, e sendo os recursos, tempo e financiamento limitados, optámos pela pesquisa de anticorpos específicos recorrendo ao Kit comercial Bio-X *Mycoplasma bovis* Elisa Kit: Bio K 260, com factor kappa (K) de 75% (Bio-X, 2009). A detecção de anticorpos contra *M. bovis* no soro de bovinos é referida como uma forma mais fiável de diagnóstico da infecção, pois os níveis de anticorpos no soro detectados por ELISA mantêm-se elevados durante vários meses (até 300 dias) (Gevaert, 2006), sendo a presença de anticorpos específicos indicativa de infecção invasiva, uma vez que animais onde *M. bovis* é apenas encontrado nas vias aéreas anteriores raramente seroconvertem (Nicholas & Ayling, 2003). A utilização de anticorpos monoclonais para identificar antígeno de *M. bovis*

no leite foi estudada por diversos autores (Boothby, Mueller, Jasper & Thomas 1986; Heller, Berthold, Pfützner, Leirer & Sachse, 1993; Infante, Infante Jr. & Flores-Gutierrez, 2002), tendo estabelecido a sensibilidade do teste em 100 CFU/ml, aliada a uma elevada especificidade. Uma vez que, teoricamente, a cultura de 1 ml de leite tem uma sensibilidade de 1 CFU/ml, e sendo habitualmente utilizada menos quantidade de leite nos testes de rotina (0,01 - 0,1ml), a cultura de *M. bovis* apresenta uma sensibilidade 10-100 vezes superior à detecção de antígeno por serologia. Contudo, a rapidez, facilidade e fiabilidade dos testes de ELISA para detectar anticorpos, utilizando anticorpos monoclonais tornam-nos valiosos como ferramenta de controlo ou monitorização da exploração, uma vez que o agente é excretado em pequenas quantidades e apenas em fase de infecção activa, isto é, de forma intermitente (Fox et al., 2005). No que respeita a técnica de PCR, Cai et al. (2005) desenvolveram uma técnica de PCR em tempo real para identificação de *M. bovis* a partir de pulmão de bovino, com alta sensibilidade (96,6%), alta especificidade (100%) e com excelente Kappa na validação de campo entre o método de PCR e cultura (K=96%). Ainda que menos sensível que os métodos de PCR, ou isolamento microbiológico, a detecção de anticorpos através de um kit comercial (K=75%) apresentou-se como uma solução prática e exequível para atingir os objectivos a que nos propusemos, uma vez que além de moroso e logisticamente mais complicado comparativamente à serologia, o isolamento e identificação de *M. bovis* a partir de pulmões ou leite contaminados nem sempre é possível, particularmente em casos crónicos, em situações de tratamentos antibióticos prolongados, deterioração das amostras, contaminação bacteriana (Nicholas & Ayling, 2003) ou pouca experiência laboratorial para o realizar, além de que a detecção de anticorpos permite detectar infecções até 300 dias antes da recolha de amostra sanguínea e não apenas infecções activas (Gevaert, 2006).

Os inquéritos epidemiológicos efectuados pretenderam obter apenas a informação essencial para a interpretação dos resultados serológicos, tendo por isso sido simples e breves. Sendo respondidos pelo veterinário assistente de cada exploração, a disponibilidade para o seu preenchimento revelou-se um factor limitante.

Epidemiologicamente, optámos por um estudo observacional transversal analítico, uma vez que este tipo de estudo permite a baixo custo e em tempo útil, sem risco para a população a estudar e sem conhecimento prévio da condição, obter informações sobre a sua prevalência com investigação de eventuais factores de risco (Noordhuizen, Frankena, Thrusfield & Graat, 2001). Por outro lado, este tipo de

abordagem não permite calcular a incidência nos animais expostos e não expostos, uma vez que os dados recolhidos são estáticos; não permite controlar variáveis externas, nem permite apurar a dinâmica da doença nos efectivos animais.

Após a selecção das 3 OPP, seguimos uma amostragem aleatória simples em duas fases. Numa primeira fase, pretendendo-se determinar a prevalência de explorações positivas a anticorpos específicos para *M. bovis*, foi efectuada uma amostragem das explorações registadas no SNIRB em cada OPP, recorrendo ao programa WinEpiscope 2.0. Assim sendo, dentro de cada OPP a unidade epidemiológica em estudo foi a exploração de bovinos. Numa segunda fase, dentro de cada exploração seleccionada, foi efectuada uma amostragem a partir do número de bovinos inscritos no SNIRB, tendo para isso sido utilizado o mesmo programa. Na OPP de Vila do Conde foram aleatoriamente amostradas 61 explorações de um total de 587 inscritas no SNIRB, em Acripinhal foram amostradas as 3 explorações de engorda inscritas na mesma OPP, e na OPP de Campo Branco foram seleccionadas 59 das 371 explorações inscritas no SNIRB.

O desvio padrão do número de bovinos por exploração em estudo nas 3 OPP demonstra a existência de uma elevada variabilidade na dimensão das explorações portuguesas, mesmo dentro de zonas geográficas bem definidas (53,1, 139,2 e 39,8 animais em Vila do Conde, Acripinhal e Campo Branco, respectivamente). Verificou-se a existência de efectivos de maior dimensão na OPP de Acripinhal (mediana de 139 animais), seguido da OPP de Vila do Conde (mediana de 67 animais) e OPP de Campo Branco (mediana de 38 animais). Consequentemente, o número de amostras recolhidas por exploração foi significativamente diferente ($p=0,012$) (Anexo 3).

Os resultados dos testes de ELISA revelam uma elevada prevalência de explorações positivas a anticorpos anti-*Mycoplasma bovis*, com 98% ($n=121$) das explorações amostradas com pelo menos um animal positivo e onde apenas 2% ($n=2$) da totalidade de explorações amostradas nas 3 OPP não apresentou nenhum animal seropositivo. As explorações em causa, uma da OPP de Vila do Conde e outra de Campo Branco, são constituídas por 2 e 3 animais respectivamente (Anexo 2), sem introdução de novos animais nos últimos 2 anos, representando animais com mais de 6 anos e mantidos apenas como companhia dos seus proprietários, pelo que o seu isolamento pode explicar a ausência de anticorpos anti-*Mycoplasma bovis* e de contacto recente com o agente. A prevalência de anticorpos específicos foi anteriormente referida como forma de avaliar a exposição a *M. bovis* em

explorações de bovinos (Poumarat, Le Grand & Bergonier, 1996; Le Grand et al., 2001; Tschopp et al., 2001; Ghadersohi, Fayazi & Hirst, 2005).

Os resultados encontrados nas 3 OPP indicam prevalência de anticorpos específicos contra *M. bovis* superior à descrita noutros estudos publicados: na Grã-Bretanha cerca de 20-25% das explorações com pneumonia apresentam anticorpos contra *M. bovis* (Nicholas et al., 2001) e no sul da Bélgica 52% das explorações e 21% dos animais apresentam anticorpos específicos. Arcangioli et al. (2008) descrevem presença de anticorpos específicos em 7% dos bovinos de carne em França e de 28% a 90% das explorações, consoante as regiões. No que respeita a prevalência em bovinos de leite, em estudos preliminares, os mesmos autores recorreram à técnica de *immunoblotting* e PCR a partir de amostras de leite de tanque, tendo os dados preliminares apontado para uma prevalência inferior a 2% das explorações em estudo. Ghadersohi et al. (1999) recorreram igualmente a uma técnica de PCR para relatar uma alta prevalência de *M. bovis* em explorações leiteiras na Austrália, 43% a 62% das explorações com animais positivos no leite, em duas regiões distintas, e uma alta prevalência do agente nas vacas com altas contagens de células somáticas.

A diferença entre os valores por nós encontrados e os descritos na literatura pode eventualmente ser devida aos sistemas produtivos da maioria das explorações poderem perpetuar a circulação de *M. bovis*, principalmente entre os animais mais jovens, devido à reduzida aplicação de medidas de biossegurança e limitada intervenção sanitária nos efectivos bovinos, ao contrário do que sucede, por exemplo, na suinicultura industrial.

A vocação produtiva é distinta para as 3 OPP: bovinos leiteiros em regime intensivo, engordas intensivas, e bovinos de carne em regime extensivo, em Vila do Conde, Acripinhal e Campo Branco, respectivamente. No que respeita a prevalência intra-exploração nas 3 OPP portuguesas em estudo, foi encontrada uma mediana de animais positivos por exploração de 50% na OPP de Vila do Conde, de 85% na OPP de Acripinhal e de 73% na OPP do Campo Branco, o que sugere uma elevada prevalência de animais com infecção passada ou presente por *Mycoplasma bovis* nas explorações das 3 OPP. Comparando as prevalências intra-exploração por OPP, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre a OPP de Vila do Conde e Acripinhal ($p=0,017$) e entre Vila do Conde e Campo Branco ($p<0,001$), não existindo diferença estatística entre Acripinhal e Campo Branco ($p>0,05$) (Anexo 3).

A diferença observada na prevalência de animais seropositivos em explorações de leite e de carne dificilmente pode ser explicada por uma predisposição genética de raças, não existindo dados que suportem esta hipótese. Os bovinos de leite são geralmente mantidos na exploração durante mais tempo que os bovinos de carne, pelo que infecções que ocorreram nos animais enquanto jovens podem já não ser detectadas no momento da recolha de sangue, devido ao declínio de anticorpos circulantes. Acresce ainda que as infecções respiratórias são mais frequentes e mais expressivas em animais com vocação de carne, sendo, em animais de vocação leiteira, apenas relevante até aos 6 meses de idade. No entanto, consideramos como factor mais importante o tipo de manejo praticado em cada um destes tipos de exploração, nomeadamente reduzido contacto dos animais jovens com vacas adultas nas explorações leiteiras e melhor monitorização da saúde dos animais neste tipo produtivo; bem como a sensibilidade dos produtores para a implementação rigorosa das medidas de biossegurança, ainda incipiente nas explorações bovinas em Portugal, principalmente nas explorações de carne de regime extensivo. Um bom exemplo é a existência de contacto com outras espécies pecuárias em 100% e 81% das explorações de Acripinhal e Campo Branco, respectivamente. Como o sistema de produção coincide com a região geográfica, não podemos excluir a possibilidade das diferenças serem devidas à região geográfica.

Relativamente aos graus de positividade, 90,5%, 58,5% e 89,2% dos animais positivos em Vila do Conde, Acripinhal e Campo Branco são de grau 1, o que indica baixo título de anticorpos, poderá sugerir infecção dos animais no passado e não infecções em fase inicial, uma vez que isso representaria o início de um surto massivo de doença nas 3 OPP em fase inicial, o que não foi relatado pelos respectivos médicos veterinários assistentes; ou, em alternativa, infecções sub-clínicas. Não foi verificada diferença estatística entre a percentagem animais com grau 1 entre as 3 OPP ($p>0,05$) (Anexo 3).

A compra de animais para reposição dos efectivos, independentemente do local de aquisição, e junção de animais de diferentes origens poderia parecer estar relacionada com a maior prevalência de animais positivos nas explorações de Acripinhal e com a presença de maior número de animais com grau 2 de positividade relativamente às outras 2 OPP: Acripinhal apresentou 30% de animais positivos de grau 2, percentagem superior aos 8% e 10% de Vila do Conde e Campo Branco. Contudo não é verificada nenhuma diferença estatística ($p>0,05$) (Anexo 3), possivelmente devido ao reduzido número de explorações de Acripinhal em estudo

(n=3). Não foram igualmente identificadas diferenças estatística entre as percentagens de animais com grau 3 ou 4 entre as 3 OPP ($p>0,05$) (Anexo 3).

A elevada prevalência de animais com baixos títulos de anticorpos anti-*Mycoplasma bovis* nas explorações portuguesas é compatível com o modelo de infecção proposto por Pfützner & Sachse (1996), que num estudo de campo envolvendo vitelos e vacas adultas, sendo os vitelos descendentes de vacas com mastite por *Mycoplasma bovis*, referem a infecção respiratória dos vitelos por *M. bovis*. Esta foi demonstrada pelo isolamento do agente e pela detecção de anticorpos específicos, sugerindo a transmissão através de aerossóis entre infectados e não infectados. No seguimento do mesmo estudo, as novilhas infectadas, no seu primeiro parto, deram origem a vitelos com infecção sistémica, levantando a hipótese não só da disseminação hematogena no mesmo animal, como também a transmissão vertical entre mães e fetos. A transmissão através do colostro foi igualmente demonstrada por Foster et al. (2009), num surto de otites em vitelos alimentados com colostro de vacas infectadas com *M. bovis*. Neste sentido, os jovens parecem assumir um papel importante na disseminação do agente dentro de cada exploração e entre explorações de venda e de compra, respectivamente.

Woldehiwet, Mamache & Rowan (1990) isolaram *Mycoplasma* spp. do tracto respiratório de 92% dos vitelos numa exploração, onde sugeriram que algumas espécies isoladas poderiam ser comensais enquanto outras teriam o potencial patogénico necessário para despoletar doença, sem ser claro quais os factores diferenciadores. Referem os mesmos autores, que o grau de colonização é função da idade e não da temperatura ou da humidade. De facto, a prevalência serológica encontrada nas 3 OPP pode ser explicada pela infecção de elevado número de animais em idade jovem, mantendo-se alguns assintomáticos até à idade adulta, momento em que infectariam animais indemnes, poderia explicar circulação do agente entre animais assintomáticos e a elevada prevalência de anticorpos em título baixo (grau 1) encontrada nas explorações das 3 OPP. Da mesma forma, a presença de maior título de anticorpos em 30% dos animais por exploração na OPP de Acripinhal (grau 2), pode ser consequência de infecção mais recente dos animais, compatível com o contacto de animais de diferentes origens e com diferentes populações microbianas nas explorações amostradas, ainda que o reduzido número de amostras na mesma OPP não permita comprovar esta hipótese ($p>0,05$) (Anexo 3).

A presença de anticorpos específicos foi detectada em 14,8% de vacas leiteiras de 164 explorações leiteiras na Austrália (n=375), não tendo sido encontrada nenhuma

associação entre a positividade serológica e a ocorrência de distúrbios reprodutivos nos animais (Petit, Spargser, Aurisch & Rosengarten, 2008). No que respeita a ocorrência de sintomatologia respiratória, é aceite que prevalência de *M. bovis* em vitelos clinicamente sãos possa atingir os 30% em explorações de engorda (Wiggins, 2007), contudo, numa exploração leiteira, parece ser indiscutível que a presença do agente numa exploração implica, mais cedo ou mais tarde, a ocorrência de casos de doença (Foster et al., 2009). Mas sendo assim, e se tantos animais foram ou estão infectados como demonstra a presença de anticorpos nas 3 OPP em estudo, continua pouco claro o motivo pelo qual na prática clínica diária parece ser dada pouca importância a *Mycoplasma bovis* como agente de DRB e de mastite em Portugal. Em França, de forma a avaliar a prevalência e importância de *M. bovis* entre os agentes envolvidos na doença respiratória de bovinos de engorda, Arcangioli et al. (2007) monitorizaram 135 vitelos de engorda em 9 explorações francesas durante surtos naturais de doença respiratória. Para *M. bovis*, BVDV, BRSV e PI3V foi avaliada a seroconversão e efectuado o isolamento bacteriano e viral a partir de lavagens broncoalveolares. *M. bovis* e outras bactérias patogénicas do tracto respiratório foram isoladas em 8 das 9 explorações em estudo e de 106 e 32 animais, respectivamente, do total de 135 animais testados. Foi identificada seroconversão para o vírus PI3 em 4 explorações, e para o BVDV e VBRS em 8 e 1 exploração respectivamente. O agente etiológico mais isolado foi o *M. bovis* nestes surtos de DRB, tendo a sua prevalência serológica e isolamento variado entre os 60-100% em cada exploração, e sempre em fases iniciais da doença. Este estudo sugere que *M. bovis* é um agente primário na DRB, depois complicada por outros agentes como PI3V, BRSV e BVDV, o que é compatível com os resultados encontrados nas 3 OPP em estudo, revelando presença de *M. bovis*, que poderá predispor os animais para doença clínica se complicada por outros agentes.

Por outro lado, num estudo realizado na Holanda, ter Laak et al. (1992a, 1992b) descrevem uma prevalência de 20% de *M. bovis* em pulmões bovinos de engorda com pneumonia, mas apenas num pequeno número de vitelos clinicamente saudáveis. Na Irlanda, *M. bovis* tem sido consistentemente isolado em 13-23% dos pulmões com pneumonia (Brice et al., 2000; Byrne et al., 2001). Em França, *M. bovis* foi isolado em 30% das explorações com pneumonia (Le Grand et al., 2001). No Reino Unido foram detectados títulos muito significativos de anticorpos contra *M. bovis* em metade de 55 explorações com pneumonia, das quais apenas 7 apresentavam anticorpos contra agentes virais: BRSV, IBRV ou BVDV (Nicholas et al., 2001). São vários os factores que desempenham um papel importante na DRB,

como agentes bacterianos e virais, bem como condições ambientais. Contudo, é crescente a importância atribuída a *M. bovis* no processo infeccioso como factor predisponente à invasão por outros agentes bacterianos, possivelmente através do seu efeito depressor do sistema imunitário dos hospedeiros (Rebhun, Guard & Rich, 1995; Poumarat et al., 2001).

Tschopp et al. (2001) confirmaram a importância de *M. bovis* como agente da DRB num estudo de campo onde 50% de 400 vitelos introduzidos em explorações infectadas desenvolveram sintomas respiratórios atribuíveis a *M. bovis*; adicionalmente demonstraram uma redução de 8% nos ganhos de peso em 55% dos vitelos que desenvolveram seropositividade 7 semanas após a sua introdução, tendo os mesmos sido tratados com o dobro dos antibióticos que os utilizados em vitelos seronegativos. Neste sentido, a prevalência encontrada nas 3 OPP portuguesas, apontam para a necessidade de ter em conta a presença de *M. bovis*, tomando medidas que minimizem o seu impacto como agente de DRB e a complicação por outros agentes patogénicos, nomeadamente a utilização de antibioterapia com espectro de acção sobre o agente. A elevada prevalência de anticorpos anti-*Mycoplasma bovis* encontrada nas 3 OPP indicia uma infecção prévia ou presente dos animais em estudo, o que pode significar propensão para o desenvolvimento de doença caso sejam infectados por outros agentes e não como agente isolado primário, e afectando provavelmente bovinos em idade jovem. Esta hipótese é coerente com a crescente importância atribuída a *M. bovis* no processo infeccioso como factor predisponente à invasão por outros agentes bacterianos, bem como com o facto de que a maioria dos problemas respiratórios dos bovinos surgirem antes do primeiro mês de idade, sendo a DRB em adultos um problema menor (Mailard, Assié & Douart, 2008). Um estudo de campo onde *M. bovis* and *P. multocida* eram frequentemente isolados numa exploração com pneumonia endémica, demonstrou que aproximadamente metade dos vitelos era excretora de *Mycoplasma* sp. aos 5 dias de idade e mais de 90% às 4 semanas. A doença clínica em vitelos, responsável por mais de 10% de mortalidade como resultado de pneumonia serofibrinosa, foi mais elevada entre os 10 e os 15 dias. Os vitelos que sobreviveram revelaram baixos ganhos de peso e atrasos no crescimento, apresentando ainda outros sinais como febre, depressão, hiperpneia, dispneia, descarga nasal, tosse intermitente moderada a contínua e perda de apetite (Stipkovits et al., 2001). A associação das lesões de *M. bovis* com as de *M. haemolytica*, *H. somni*, ou *P. multocida*, isoladas ou em combinação, são frequentes, indicando sinergismo entre estes agentes patogénicos. Alguns autores sugerem que

M. bovis pode colonizar e perpetuar as lesões iniciadas por *M. haemolytica*, *H. somni* ou *P. multocida*, mesmo em situações onde os outros agentes foram eliminados por terapia antimicrobiana e resposta imunitária. Nestas situações *M. bovis* pode persistir dado que muitas estirpes são resistentes aos antibióticos habitualmente utilizados no tratamento da DRB em bovinos de engorda, ao mesmo tempo que a variabilidade das lipoproteínas de superfície do agente pode permitir a evasão à resposta imunitária do hospedeiro (ter Laak et al., 1992a; Le Grand et al., 1996; Ayling et al., 2000; Thomas et al., 2003). Ainda que *M. bovis* possa colonizar pulmões de bovinos sem sintomas clínicos, alguns autores referem que este microorganismo poderá ter a capacidade de proliferar e expressar virulência nas lesões pulmonares provocadas por outros agentes, conduzindo a situações crónicas resistentes a antibióticos e auto-perpetuantes (Gagea et al., 2006b). Ainda que não completamente provada, esta hipótese reforça a importância da prevenção e identificação precoce da presença de outros agentes respiratórios com efeito sinérgico nas infecções por *M. bovis*, como forma racional de evitar as complicações por ele provocadas (Gagea et al., 2006b).

No que respeita os bovinos leiteiros, e por conseguinte a OPP de Vila do Conde, sendo a elevada prevalência de anticorpos anti-*Mycoplasma bovis* reveladora do contacto dos animais com o agente, poderá existir um sub-diagnóstico de mastites e / ou DRB por *Mycoplasma bovis* nas explorações em estudo. Fox et al. (2005) referem a existência de vacas portadoras assintomáticas de *M. bovis* como fonte de infecção em explorações indemnes, o que pode justificar a circulação do agente sem doença clínica constante associada. Sendo a prevalência de explorações leiteiras positivas a *M. bovis* no leite de tanque de 3% (Pinho et al., comunicação pessoal, 2009, dados não publicados), a elevada percentagem de animais com anticorpos poderá reflectir infecções extra-mamárias, infecções sub-clínicas ou uma baixa capacidade patogénica de *M. bovis* como agente de mastite.

Nos inquéritos epidemiológicos, a ausência da história clínica das explorações amostradas e da idade dos animais amostrados são lacunas importantes na interpretação crítica dos resultados, impossibilitando a associação da prevalência intra-exploração e grau de positividade com a ocorrência de sintomatologia clínica por OPP. A profilaxia vacinal das explorações amostradas revela uma preocupação reduzida com os agentes de doença respiratória nas 3 OPP, revelando a importância reconhecida à enterotoxémia nos bovinos de carne (engorda e extensivo) e a ausência de hábitos profiláticos nas explorações de vocação leiteira de Vila do

Conde, estando a ser iniciada sensibilização dos produtores para a sua realização no futuro próximo, com alguns resultados visíveis (tabela 22.).

Face à elevada prevalência de anticorpos encontrada nas 3 OPP, não foi possível avaliar as variáveis obtidas nos inquéritos epidemiológicos como factores de risco para a sua presença.

Para aprofundar os conhecimentos sobre a epidemiologia de *M. bovis* na região em estudo, seria útil a realização de um estudo prospectivo, com avaliações serológicas periódicas individuais dos animais de várias classes etárias, bem como avaliações bacteriológicas dos mesmos para por um lado melhor compreender a dinâmica de anticorpos específicos nos animais e por outro lado verificar se nos animais seropositivos é também possível identificar o agente causal e em que medida a presença de diferentes graus de anticorpos reflectem a infecção e excreção de *M. bovis*.

A prevalência de anticorpos específicos encontrada nos dois momentos sugere que *Mycoplasma bovis* é um agente a considerar nas OPP estudadas, podendo representar um risco acrescido para a rentabilidade e produtividade dos animais, pelo que a antibioterapia e medidas sanitárias instituídas deverão considerar a presença do agente.

3) Estudos de caso

3.1) Exploração de engorda

3.1.1) Introdução

O transporte de animais é um factor predisponente para o desenvolvimento de DRB em bovinos devido à imunossupressão originada pela sobrelotação, jejum prolongado, má circulação de ar e stress excessivo (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2007). Sendo *M. bovis* um dos agentes envolvidos na DRB (Arcangioli et al., 2007), a entrada de animais numa exploração de engorda após o transporte será um bom momento para avaliar a evolução de títulos de anticorpos específicos ao longo do tempo e a sua eventual relação com a ocorrência de sintomatologia clínica. Em duas explorações de bovinos de engorda com graves problemas de DRB, Gevaert, Passchyn & Theys (2008) utilizaram a serologia para estudar a cinética da infecção por *Mycoplasma bovis* ao longo do tempo, tendo validado a utilização de testes de ELISA para o efeito em condições de campo.

O presente estudo pretendeu avaliar a evolução do título de anticorpos contra *M. bovis* em bovinos de engorda após o transporte, durante um período de 4 semanas, com o intuito de melhor entender a cinética de infecção por *M. bovis* na exploração em causa.

3.1.2) Materiais e métodos

Numa exploração de bovinos de engorda localizada no concelho de Ourém, foi seleccionado um parque de 40 animais, com idades compreendidas entre os 3 e os 4 meses, de raça frísia. Um dia (dia 1) após a entrada na exploração (dia 0), todos os animais foram colocados na manga, pesados, desparasitados, vacinados (Rispoval 4, Rispoval P, Pfizer Saúde Animal; Convexin 10, Intervet-Schering-plough) e sujeitos a tratamento antibiótico metafilático (n=19: Baytril One, 7,5ml/100kg, Bayer Saúde Animal; ou Draxxin, 4ml/100Kg, Pfizer Saúde Animal). Foi ainda registada a temperatura individual e recolhida uma amostra sanguínea de cada animal.

Após 4 semanas, foi efectuada a revacinação aplicável e realizada nova recolha de sangue individual. As amostras sanguíneas foram submetidas a pesquisa de

anticorpos anti-*Mycoplasma bovis* segundo um método de ELISA indirecto semi-quantitativo (Bio-X *Mycoplasma Bovis* Elisa Kit: Bio K 260) no laboratório da FMV-UTL. Os resultados são expressos com escala de 0 (negativo) a 4 (máximo da positividade) (secções 2.2.5, 2.2.6, 2.2.6.1, 2.2.6.2 e 2.2.6.3).

Foram registados os tratamentos individuais efectuados no período do estudo, bem como a ocorrência de episódios clínicos. O ensaio decorreu entre 5 e 31 de Março de 2009. No dia 3, foi registada novamente a temperatura individual.

Todos os resultados obtidos nos testes de ELISA foram introduzidos numa base de dados Microsoft Excel 2003 e exportados para o programa SPSS (SPSS, 2009), tendo sido efectuada uma análise descritiva dos dados, seguindo-se o teste de hipóteses, pelo teste de Wilcoxon Signed Ranks.

3.1.3) Resultados

No dia 1 do estudo, 97,5% (n=39) dos animais demonstraram seropositividade para *Mycoplasma bovis* (gráfico 2). Decorridos 30 dias, foi verificada seropositividade em 100% dos animais (gráfico 3). A cinética individual de anticorpos, traduzida pela diferença de grau entre os dois momentos (“grau no dia 30” menos “grau no dia 1”) é apresentada no gráfico 4. Esta diferença é referida em valores de -2 a +2, consoante a diminuição ou o aumento do grau de anticorpos detectado. No dia 3, metade dos animais apresentou temperatura superior a 39,5°C. Durante o período do estudo, não foi observada sintomatologia clínica compatível com micoplasmose bovina em nenhum dos animais, não tendo sido realizado qualquer tratamento adicional.

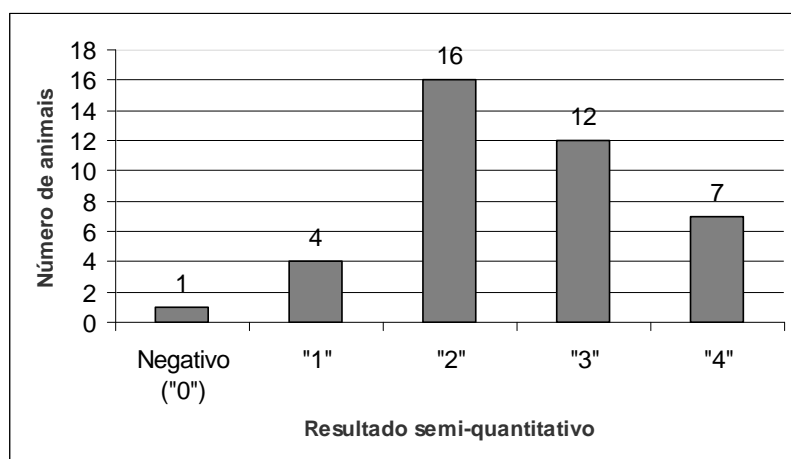


Gráfico 2. Resultados semi-quantitativos dos testes individuais em número absoluto no dia 1 do estudo.

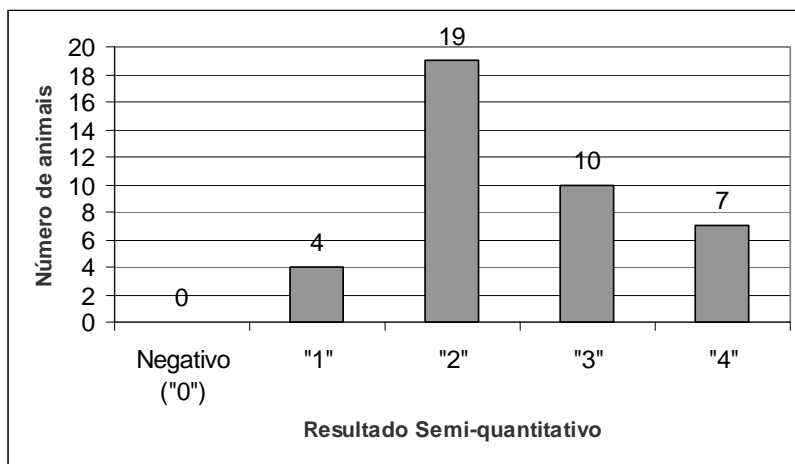


Gráfico 3. Resultados semi-quantitativos dos testes individuais em número absoluto no dia 30 do estudo.

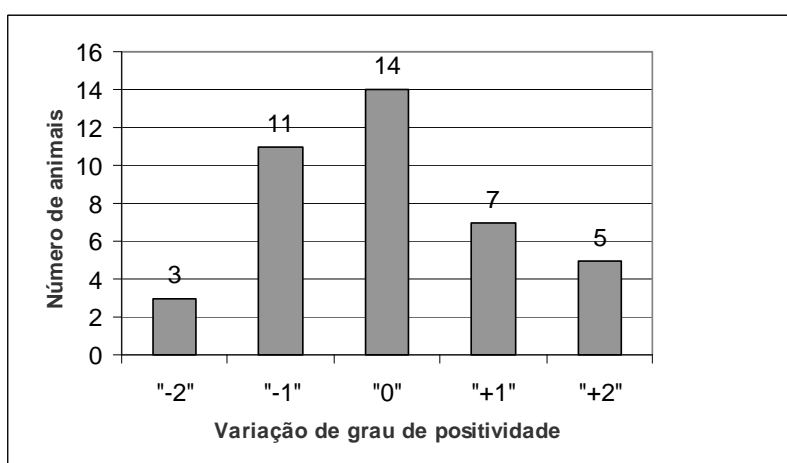


Gráfico 4. Variação do grau de positividade entre os dois momentos, traduzidos pela diferença de grau entre o dia 1 e o dia 30.

A evolução do título de anticorpos após 30 dias demonstrou variabilidade individual: 35% manteve o título ($n=14$), 35% diminuiu ($n=14$) e 30% aumentou o título de anticorpos ($n=12$), não existindo diferença estatística entre os resultados serológicos no dia 1 e no dia 30 ($p>0,05$) (Anexo 3). O animal que não apresentava anticorpos contra *Mycoplasma bovis* no dia 1, seroconverteu ao fim de 30 dias.

3.1.4) Discussão

O estudo sero-epidemiológico de prevalência de *M. bovis* referido no capítulo 2 da presente dissertação, apenas contempla a uma recolha de cada animal amostrado, pelo que não é possível interpretar a evolução de anticorpos ao longo do tempo em cada animal. Por outro lado, o mesmo estudo apenas incidiu sobre animais com mais de 6 meses de idade, pelo que a prevalência de anticorpos em animais mais jovens e a sua evolução ao longo do tempo serão importantes para esclarecer a

epidemiologia do agente em explorações de engorda portuguesas. O presente estudo decorreu numa exploração de engorda com organização e funcionários que permitiram o seu sucesso, uma vez que a recolha sistemática de amostras de sangue neste tipo de bovinos representa horas de trabalho extra no quotidiano da exploração.

São vários os estudos que confirmam *M. bovis* como a bactéria mais frequentemente identificada em bovinos de engorda afectados por pneumonias crónicas refractárias a tratamento antibiótico (Haines et al., 2001), e num estudo realizado na Holanda, ter Laak et al. (1992a, 1992b) descrevem uma prevalência de 20% de *M. bovis* em pulmões bovinos de engorda com pneumonia, mas apenas num pequeno número de vitelos clinicamente saudáveis.

A prevalência de animais com anticorpos contra *Mycoplasma bovis* nos animais em estudo (3 a 4 meses de idade) é elevada no momento de entrada na exploração, o que indicia infecção prévia dos animais, provenientes de vitleiros. Esta observação é compatível com modelo de infecção proposto por Pfutzner & Sachse (1996) atrás referido, que sugere a transmissão de mães infectadas à descendência e a transmissão através de aerossóis entre animais infectados e não infectados, parecendo ser os jovens os responsáveis pela disseminação do agente dentro da exploração e entre explorações de venda e de compra, respectivamente, estando a evolução da doença clínica dependente de outros agentes e factores.

A utilização de antibioterapia metafilática com acção sobre *Mycoplasma bovis* poderá ter influenciado o curso de uma eventual infecção prévia, não permitindo o desenvolvimento de sinais clínicos nos animais. Este passo poderá ter reflexos sobre a cinética da seroconversão verificado, não tendo contudo dados que permitam comprovar a hipótese, uma vez que todos os animais foram metafilaticamente tratados. Nagatomo et al. (1996) referem o tratamento de um grupo de vitelos com leucomicina antes do desenvolvimento de sinais clínicos, onde o grupo não tratado apresentou uma mortalidade de 41%, enquanto no grupo tratado todos os animais sobreviveram, ainda que com sinais clínicos de doença respiratória. Curiosamente, enquanto no grupo não tratado foram detectados anticorpos contra *M. bovis* ao fim de 2 meses após a introdução, o desenvolvimento de anticorpos foi significativamente mais tardio no grupo tratado: 8 meses. Este facto sugere que a resposta imunitária é pouco eficiente nas infecções por micoplasma, sendo o desenvolvimento de anticorpos mais tardio com a utilização de antibioterapia com acção sobre *M. bovis*.

No presente estudo, a variabilidade individual referida na cinética de anticorpos durante 30 dias poderá ser explicada por diferentes momentos de infecção por *M. bovis*, por respostas imunitárias distintas de animal para animal ou por influência do tratamento metafilático na evolução de anticorpos.

A prevalência de animais seropositivos encontrada nos dois momentos sugere que *Mycoplasma bovis* é um agente a considerar na exploração estudada, podendo representar um risco acrescido para a rentabilidade e produtividade dos animais.

Seria interessante complementar o presente estudo através da comparação dos perfis de anticorpos entre animais tratados metafilaticamente com antibioterapia activa sobre *M. bovis* e não tratados, sujeitos às mesmas condições de manejo, com o objectivo compreender melhor a epidemiologia do *Mycoplasma bovis* na exploração em causa, e eventual efeito da antibioterapia no perfil da resposta imunitária dos animais.

3.2) Exploração Leiteira

3.2.1) Introdução

O diagnóstico da infecção por *M. bovis* pode ser realizado através de métodos microbiológicos, serológicos ou moleculares (Nicholas & Baker, 1998). O isolamento de *M. bovis* a partir de pulmões ou leite contaminados, além de moroso, nem sempre é possível devido à utilização prolongada de antibióticos, infecções crónicas ou dificuldades laboratoriais no seu isolamento microbiológico (Nicholas & Ayling, 2003), sendo a detecção de anticorpos contra *M. bovis* no soro de bovinos referida como uma forma fiável de diagnóstico da infecção, ainda que não seja esclarecedora sobre o local e momento de infecção (Gevaert, 2006). Com o objectivo de verificar se nos animais seropositivos é também possível identificar o agente causal e em que medida a presença de diferentes graus de anticorpos reflectem a infecção e excreção mamária de *M. bovis* identificado simultaneamente por métodos culturais e moleculares, foi comparado um teste comercial de ELISA para detecção de anticorpos específicos (Bio-X, Bélgica) com o isolamento microbiológico e confirmação por PCR a partir de amostras individuais de leite.

O presente estudo de caso resulta da colaboração entre 2 projectos independentes, aproveitando sinergias laboratoriais entre o método serológico de ELISA realizado no CIISA e o isolamento microbiológico com confirmação por técnicas moleculares realizado na Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB) do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.

3.2.2) Materiais e métodos

Foi estudada uma exploração leiteira intensiva no Concelho de Anadia com 264 bovinos leiteiros de raça Holstein com história prévia de mastites, artrites e pneumonias e diminuição da eficiência reprodutiva.

Em Dezembro de 2008 foi efectuada recolha individual de sangue e as amostras sanguíneas foram submetidas a pesquisa de anticorpos anti-*Mycoplasma bovis* segundo um método de ELISA indirecto semi-quantitativo (Bio-X *Mycoplasma bovis* Elisa Kit: Bio K 260) no laboratório da FMV-UTL (ver secções 2.2.5, 2.2.6, 2.2.6.1, 2.2.6.2 e 2.2.6.3). Os resultados são expressos com escala de 0 (negativo) a 4 (máximo da positividade) e foram armazenados numa base de dados Microsoft Excel 2003, como descrito na secção 2.2.7.

No mesmo período, a UMIB no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), recolheu amostras de leite assépticas da totalidade dos animais (n=246), tendo sido armazenadas a -35 °C até ao seu processamento. Cada amostra foi inoculada em meio líquido de enriquecimento Hayflick modificado (Oxoid) suplementado com 5 antibióticos (sal sódico de ampicilina, SIGMA; bacitracina, SIGMA; sal sódico cefoperazona, SIGMA; metilicina, Beecham Research Laboratories; acetato de tálio, Merck) e incubadas durante 7 dias numa atmosfera com 10% de CO₂ a 37 °C. 500 µL foram depois inoculados em placas de 45 mm de agar Hayflick modificado (Oxoid) suplementado com os mesmos 5 antibióticos e incubadas durante 7 dias. As placas foram observadas 3 e 7 dias após a inoculação para identificação de colónias típicas, tendo sido realizados testes de actividade bioquímica para confirmação da presença de *M. bovis*. Adicionalmente foi utilizado um kit comercial (Puregene, Gentra System) para extracção de DNA de todos os meios de enriquecimento inoculados e de todos os isolados positivos baseados no desenvolvimento de colónias e testes bioquímicos. Subsequentemente foi realizado PCR do DNA extraído para detecção de *Mycoplasma* spp. e *M. bovis* (Subramaniam et al. 1998). Os resultados foram enviados ao CIISA em Microsoft Excel 2003.

Foi realizado o questionário referido em 2.2.4).

Todos os resultados obtidos nos testes de ELISA foram introduzidos numa base de dados Microsoft Excel 2003 e exportados para o programa SPSS (SPSS, 2009), tendo sido efectuada uma análise descritiva dos dados, seguindo-se o teste de hipóteses, pelo teste de Qui-quadrado de Pearson.

3.2.3) Resultados

Serologicamente, 6% (n=16) dos animais testados não apresentaram anticorpos anti-*Mycoplasma bovis*, sendo os restantes 94% (n=248) positivos em diferentes graus (Tabela 23).

Tabela 23. Resultados semi-quantitativos dos testes individuais em número absoluto e em percentagem.

	0 (neg.)	1	2	3	4	Total
Nº de animais	16	103	93	40	12	264
% de animais	6%	39%	35%	15%	5%	100%

neg.- negativo

Mycoplasma bovis, confirmado por isolamento microbiológico e PCR foi o agente etiológico mais prevalente na exploração (Pinho et al., comunicação pessoal, 2009, dados não publicados). Mastite e fertilidade diminuída foram os sinais mais importantes observados no efectivo adulto com consequente decréscimo na produção leiteira média e performance reprodutiva, tendo sido observadas pneumonias nos animais jovens. A taxa de refugo aumentou como resultado de artrites, mastites e do refugo de animais cronicamente infectados e refractários aos tratamentos (Pinho et al., 2009, comunicação pessoal, dados não publicados).

Das 264 vacas testadas serologicamente, apenas 253 foram testadas microbiologicamente e por PCR, devido a erros na identificação individual de amostras. Após cultura microbiológica e PCR, foram identificadas 15% (n=39) de vacas com crescimento microbiológico e respectiva identificação bioquímica e molecular de *M. bovis* (Pinho et al., comunicação pessoal, 2009, dados não publicados).

Todas as vacas positivas à microbiologia e PCR apresentaram anticorpos anti-*Mycoplasma bovis* (n=39), das quais 7% (n=7) apresentaram grau serológico de 1, 12% (n=11) grau serológico de 2, 27% (n=11) grau serológico de 3 e 75% (n=9) grau serológico de 4 (Tabela 24).

De acordo com o teste de Qui-quadrado de Pearson, verificam-se a existência de diferenças significativas entre as proporções de positivos à microbiologia nos diferentes graus de positividade à sorologia $p < 0,001$ ($p = 1,63 \times 10^{-7}$) (Anexo 3).

Tabela 24. Resultados semi-quantitativos dos testes serológicos individuais das vacas positivas a *Mycoplasma bovis* no leite através de microbiologia, bioquímica e PCR.

			Microbiologia		Total
			Negativo	Positivo	
Grau Serológico	1	Total	95	7	102
		%	93,1%	6,9%	100,0%
	2	Total	83	11	94
		%	88,3%	11,7%	100,0%
	3	Total	33	12	45
		%	73,3%	26,7%	100,0%
	4	Total	3	9	12
		%	25,0%	75,0%	100,0%
Total		Total	214	39	253
		%	84,6%	15,4%	100,0%

Na exploração em estudo os animais com mais de 8 meses são vacinados (BVDV/IBRV/PI3/BRSV) por rotina, a compra de animais é efectuada em negociantes ou noutras explorações, há partilha de espaços entre os bovinos com caprinos e suínos da exploração, não existindo contacto com bovinos de outras explorações.

3.2.4) Discussão

A prevalência de animais com anticorpos anti-*Mycoplasma bovis* na exploração em estudo é de 94% (n=250), indicando infecção prévia ou presente pelo agente, o que é compatível com a história clínica descrita e confirmação do agente causal identificado pela UMIB. A detecção de anticorpos contra *M. bovis* no soro de bovinos é considerada uma forma fiável de diagnóstico da infecção, uma vez que os níveis de anticorpos no soro detectados por ELISA se mantêm elevados durante vários meses (até 300 dias) (Gevaert, 2006). Por outro lado, a detecção de anticorpos contra *Mycoplasma bovis* revela exposição ao agente e infecção prévia (Nicholas & Ayling 2003) e não necessariamente a presença de infecção activa (Fox et al., 2005). A técnica de PCR assume-se como uma forma muito sensível e específica para confirmar a infecção mamária em bovinos, contudo a elevada heterogeneidade genética e antigénica de micoplasmas, associada a semelhanças descritas em estirpes de *M. bovis* e *M. agalactiae* dificultam a sua aplicação e identificação por outros métodos moleculares (Subramaniam et al., 1998), bem como a necessidade de cultura microbiológica prévia.

Como referido, das 264 vacas testadas serologicamente, somente 253 foram testadas microbiologicamente e por PCR, devido a erros na identificação individual de amostras. Após cultura microbiológica e PCR de amostras de leite, apenas 15% (n=39) de vacas apresentaram crescimento microbiológico, com identificação bioquímica e molecular de *M. bovis*. Nenhuma destas foi seronegativa, não tendo por isso sido identificados falsos positivos na serologia.

As culturas microbiológicas falso-negativas são referidas na literatura como um risco, na medida em que algumas vacas são apenas disseminadores intermitentes de *Mycoplasma* sp. no leite, sendo estimado que 40% das vacas excretam menos que 100 CFU/ml por teto infectado (Biddle, Fox & Hancock, 2003). Compreende-se que potenciais problemas com a especificidade, sensibilidade e tempo necessário para o diagnóstico cultural, tornem esta abordagem longe de ideal (Biddle et al., 2004). Ainda que a discrepância entre serologia e isolamento microbiológico possa ser atribuída a variações na resposta imunitária individual ao agente, fases iniciais de infecção, infecções ultrapassadas ou infecções extra-mamárias, este facto é compatível com a referência de Petit et al. (2008) à presença de anticorpos contra *M. bovis* em 16% das vacas de uma exploração em que o agente foi apenas isolado a partir de uma zaragatoa cervical de um animal. Dos resultados semi-quantitativos obtidos nos testes de ELISA individuais, as 39 vacas que excretaram o agente no

leite correspondem a 7% dos resultados grau 1, a 12% dos resultados grau 2, a 27% dos resultados grau 3 e a 75% dos resultados grau 4, o que demonstra a existência de diferenças significativas entre as proporções de positivos à microbiologia nos diferentes graus de positividade à sorologia $p<0,001$ (Anexo 3). Estes resultados permitem concluir que a probabilidade de excreção do microorganismo no leite é tanto mais elevada quanto maior o grau de seroconversão detectado no teste comercial de ELISA utilizado, principalmente o grau 4. Da mesma forma, animais com grau 1, 2 ou 3 de anticorpos em determinado momento têm pouca probabilidade de activamente excretar a bactéria no leite.

Estes resultados sugerem que *M. bovis* tem uma elevada prevalência nos animais em estudo, mas que, em cada ponto temporal, apenas alguns destes animais estão em fase de excreção activa pelo leite. Assim, outros factores com influência sobre a expressão clínica de *M. bovis* deverão ser alvo de estudos futuros.

4) Conclusões gerais

Em bovinos, além de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (Peripneumonia Contagiosa Bovina), *Mycoplasma bovis* é a espécie mais patogénica do género *Mycoplasma*, sendo responsável por pneumonias, mastites, artrites, queratoconjuntivites, otites e infertilidade (Nicholas & Ayling, 2003; Stipkovits & Szathmary, 2008). A infecção surge em explorações indemnes através da introdução de animais infectados assintomáticos, fomites, leite ou sêmen de animais infectados, sendo a transmissão do agente entre os animais da mesma exploração importante para a manutenção do agente nos efectivos. Uma vez estabelecida a infecção nos bovinos de uma exploração, a erradicação torna-se quase impossível (Nicholas & Ayling, 2003). Ainda que seja um agente subestimado, o impacto económico do agente é apontado como elevado na indústria da carne e do leite (Reeve-Johnson, 1999; Rosengarten & Citti, 1999; Nicholas & Ayling, 2003; Gevaert, 2006), pelo que o conhecimento da sua epidemiologia em Portugal poderá ser um contributo para a competitividade produtiva do sector no nosso país.

Neste trabalho foram realizados 3 projectos independentes, com o microorganismo *Mycoplasma bovis*, mais concretamente os seus anticorpos específicos, como objecto de estudo comum.

No primeiro procurámos a prevalência a nível das OPP de Vila do Conde, Acripinhal e Campo Branco, amostrando apenas os animais com mais 6 meses de idade e por isso constantes da lista do PISA, como forma de caracterizar a prevalência de anticorpos em cada exploração das diferentes OPP, com o intuito de compreender em que tipo e regime de exploração bovina existiria maior prevalência de contacto com a bactéria. Se por um lado a presença de anticorpos nos indica infecção prévia até 300 dias (Gevaert, 2006), garantindo uma janela temporal confortável para conhecer a extensão da disseminação deste microorganismo nas explorações tipo de cada OPP, por outro lado deixou em aberto questões importantes para a compreensão dos resultados obtidos. Quais os factores de risco para a presença de anticorpos, como evoluem os anticorpos ao longo do tempo, qual o significado clínico da presença de anticorpos nos diferentes graus (1 a 4) e qual a sua relação com excreção activa do agente foram as perguntas que conduziram à inclusão dos inquéritos epidemiológicos e dos 2 estudos de caso.

Os resultados dos testes de ELISA revelam uma elevada prevalência de explorações positivas a anticorpos anti-*Mycoplasma bovis*, com 98% (n=123) das

explorações amostradas com pelo menos um animal positivo. A diferença entre os valores por nós encontrados e os descritos na literatura para a prevalência de explorações seropositivas pode eventualmente ser devida a uma maior proximidade geográfica entre as explorações portuguesas, o que pode facilitar a disseminação de *M. bovis*. Também pode contribuir o facto de os sistemas produtivos da maioria das explorações perpetuarem a circulação de *M. bovis*, principalmente entre os animais mais jovens, devido à reduzida aplicação de medidas de biossegurança e limitada intervenção sanitária nos efectivos bovinos, ao contrário do que sucede, por exemplo, na suinicultura industrial.

No que respeita a prevalência intra-exploração nas 3 OPP portuguesas em estudo, foi encontrada uma mediana de animais positivos por exploração superior nas explorações de engorda intensiva (85%) e carne extensiva (79%) comparativamente às explorações intensivas de vocação leiteira (50%). Esta diferença dificilmente pode ser explicada por uma predisposição genética de raças de diferente aptidão produtiva, não existindo dados que suportem esta hipótese. Os bovinos de leite são geralmente mantidos na exploração durante mais tempo que os bovinos de carne, pelo que infecções que ocorreram nos animais enquanto jovens podem já não ser detectadas no momento da recolha de sangue, devido ao declínio de anticorpos circulantes. Por outro lado, se as infecções respiratórias nas explorações de vocação leiteira assumem principal relevância nos animais até aos 6 meses de idade, elas são mais frequentes e mais expressivas em animais com vocação de carne, principalmente nas engordas onde é frequente a junção brusca de animais com diferentes origens e com diferentes populações microbianas das explorações de origem. Consideramos no entanto, como factor mais importante, o tipo de manejo praticado em cada um destes tipos de exploração, nomeadamente o reduzido contacto dos animais jovens com as mães nas explorações leiteiras e melhor monitorização da saúde dos animais neste tipo produtivo; bem como a sensibilidade dos produtores para a implementação rigorosa das medidas de biossegurança, ainda incipiente nas explorações bovinas em Portugal, principalmente nas explorações de carne de regime extensivo.

De facto, a prevalência de animais com anticorpos contra *Mycoplasma bovis* nos animais do estudo de caso 1 (3 a 4 meses de idade) é elevada no momento de entrada na exploração, o que indicia infecção prévia dos animais, provenientes de 2 viteiros de explorações de vocação leiteira. Este facto parece reforçar a importância dos animais jovens na disseminação do agente dentro de cada exploração e entre explorações de venda e de compra, respectivamente, o que pode

explicar porque nos animais das 3 OPP, (todos com mais de 6 meses de idade, uma vez que a sua identificação foi retirada do SNIRB), 90 % dos resultados serológicos positivos correspondem a grau 1, correspondendo a infecções prévias e a re-infecções por animais assintomáticos. Adicionalmente, a elevada prevalência de anticorpos específicos contra *M. bovis* parece indicar que o microorganismo, sendo ubiqüitário nas explorações estudadas, necessitará de outros agentes patogénicos ou de outros factores para despoletar doença clínica, factores esses que não conseguimos identificar devido à ausência de registos nas explorações das OPP estudadas. Seja qual for o agente patogénico em causa nas explorações portuguesas, esta lacuna limitará sempre o trabalho do médico veterinário e restantes profissionais de saúde animal na procura de relações de causa-efeito e desenho de estratégias de controlo adequadas a cada ameaça.

O estudo de caso 1 demonstrou igualmente a inexistência de diferença entre o grau no dia de entrada na exploração e o grau no dia 30, indicando variabilidade individual no desenvolvimento de anticorpos, bem como a eficácia da metafilaxia antimicrobiana na redução da manifestação de sinais clínicos durante os primeiros 30 dias após entrada na exploração.

O estudo de caso 2, permitiu concluir que a probabilidade de excreção do microorganismo no leite é tanto mais elevada quanto maior o grau de seroconversão detectado no teste comercial de ELISA utilizado, principalmente o grau 4. Da mesma forma, animais com grau 3, 2 ou 1 de anticorpos em determinado momento têm progressivamente menos probabilidade de activamente excretar a bactéria no leite, tendo sido inexistentes falsos positivos no teste serológico. Ao considerar os resultados obtidos nas OPP, verificamos que apenas 12 animais apresentaram grau 4 entre os 2157 positivos (Anexo 2). Ainda que neste estudo de caso o isolamento do microorganismo tenha apenas sido efectuada a partir de amostras de leite, ficando por esclarecer se na infecção respiratória existe ou não a mesma relação, é claro que apenas seriam excretores de *M. bovis* 2 dos animais seropositivos na OPP de Vila do Conde (Anexo 2). Este facto poderá representar baixa capacidade patogénica do agente *per se*, estando assim dependente de outros factores / bactérias / vírus para causar doença, ou, por outro lado, sub-diagnóstico de infecções clínicas passadas, já com títulos de anticorpos descendentes, hipótese pouco provável dada a prevalência de mastite clínica de 5% na OPP de Vila do Conde (anónimo, 2009). Seria interessante a averiguação da mesma relação entre excreção activa e resultado serológico nas infecções respiratórias, para melhor

interpretação dos resultados serológicos nestas infecções e consequente aplicação de medidas terapêuticas ou preventivas adequadas.

A prevalência de anticorpos específicos encontrada nos 3 projectos sugere que *Mycoplasma bovis* é um agente a considerar como importante nas explorações de bovinos portuguesas, tanto em explorações de vocação leiteira como em explorações engorda e de carne, o que, extrapolando dados económicos de outros países, poderá representar um risco acrescido para a rentabilidade e produtividade dos animais, ainda que o seu papel patogénico pareça estar dependente da interacção com outros factores / microorganismos. Nesse sentido, enquanto não há vacinas eficazes disponíveis no mercado, a monitorização do microorganismo ou anticorpos específicos nos efectivos, as medidas de higiene, biossegurança e utilização de antibioterapia com espectro de acção sobre o microorganismo no tratamento de surtos clínicos, são imprescindíveis para manter a presença do agente a níveis compatíveis com a saúde e com a economia da exploração.

5) Bibliografia

- Adegboye, D.S., Rasberry, U., Halbur, P.G., Andrews, J.J. & Rosenbusch, R.F. (1995). Monoclonal antibody-based immunohistochemical technique for the detection of *Mycoplasma bovis* in formalinfixed, paraffin embedded calf lung tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations*, 7, 261-265.
- Aduriz, J.J., Escobal, I., Salazar, L.M., Contreras, A. & Marco, J.C. (1996). Efficacy of enrofloxacin during the lactation against mastitis caused by *Mycoplasma bovis* in dairy cattle. *Proceedings of the XIX Buiatrics Congress*: Edinburgh, U.K. July, p.310-311.
- Alberti, A., Addis, M.F., Chessa, B., Cubeddu, T., Profiti, M., Rosati, S., Ruiu, A. & Pittau, M. (2006). Molecular and antigenic characterization of a *Mycoplasma bovis* strain causing an outbreak of infectious keratoconjunctivitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations*, 18, 41-51.
- Antunes, N.T.G., Tavío, M.M., Gonçalves, R., Rifatbegovic, M., Assunção, P., Rosales, R.S., Regalla, J. & Poveda, J.B. (2008). Resistência a antimicrobianos em estirpes de campo de *Mycoplasma bovis* originárias de diversas localizações geográficas [abstract]. *Livro de resumos do IV Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, INRB INIA / Fonte Boa, Santarém, 27-29 de Novembro*, poster nº 38, pp. 145.
- Arcangioli, M.A., Duet, A., Meyer, G., Dernburg, A., Bézille, P., Poumarat, F. & Le Grand, D. (2007). The role of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease outbreaks in veal calf feedlots. *The Veterinary Journal*, 177, 89-93.
- Arcangioli, M.A., Botrel, M.A., Chazel, M., Sellal, E., Bézille, P., Poumarat, F. & Le Grand, D. (2008). Prevalence of *Mycoplasma* infection in french dairy cattle [abstract]. In F. Tiborné, S. Judit & V. Miklós (Eds.) *Oral and Poster Abstracts of the XXV Jubilee World Buiatrics Congress, 6-11 July 2008*, Vol. 130, Supplement II, pp.328, Budapest, Hungary: Hungarian Veterinary Journal.
- Askaa, G. & Ernø, H. (1976). Evaluation of *Mycoplasma agalactiaesubsp. bovis* to species rank *Mycoplasma bovis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 26, 323-325.
- Atalaia, V. (1983). Contribuição para o estudo das mamites bovinas da região do Ribatejo-Oeste. *Repositório de Trabalhos do L.N.I.V.*, XV, 97.
- Ayling, R.D., Nicholas, R.A.J. & Johansson, K.E. (1997). Application of the polymerase chain reaction for the routine identification of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Record*, 141, 307-308.

- Ayling, R.D., Baker, S.E., Peek, M.L., Simon, A.J. & Nicholas, R.A.J. (2000). Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis* strains in Northern Ireland. *Veterinary Record*, 146, 745-747.
- Ball, H.J., Reilly, G.A.C. & Bryson, D.G. (1995). Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma bovis* strains in Northern Ireland. *Irish Veterinary Journal*, 48, 316-318.
- Ball, H.J. & Findlay, D. (1998). *Diagnostic applications of monoclonal antibody-based sandwich ELISAs*. In: Miles, R.J., Nicholas, R.A.J. (Eds.), *Mycoplasma Protocols*. Humana Press, Totowa, USA, pp. 127-132.
- Bayoumi, F.A., Farver, T.B., Bushnell, B. & Oliveria, B. (1988). Enzootic *mycoplasmal* mastitis in a large dairy during an eight-year period. *J Am Vet Med Assoc*, 192, 905-909.
- Bennett, R.H. & Jasper, D.E. (1978). Immunologic and pathologic responses of cows to naturally occurring *Mycoplasma bovis* mastitis. *Vet. Micro.*, 2, 325-340.
- Bicknell, S.R., Gunning, R.E., Jackson, G., Boughton, E. & Wilson, C.D. (1983). Eradication of the *Mycoplasma bovis* infection from a dairy herd in Great Britain. *Veterinary Record*, 112, 294-297.
- Biddle, M.K., Fox, L.K. & Hancock, D.D. (2003). Patterns of *Mycoplasma* shedding in the milk of dairy cows with intramammary *Mycoplasma* infection. *J Am Vet Med Assoc*, 223, 1163-1166.
- Biddle, M.K., Fox, L.K., Hancock, D.D., Gaskins, C.T. & Evans, M.A. (2004). Effects of storage time and thawing methods on the recovery of *Mycoplasma* species in milk samples from cows with intra-mammary infections. *J Dairy Sci.*, 87, 933-936.
- Boothby, J.T., Mueller, R., Jasper, D.E. & Thomas, C.B. (1986). Detecting *Mycoplasma bovis* in milk by enzyme-linked immunosorbent assay, using monoclonal antibodies.. *Am. J. Vet. Res.*, 47, 1082-1084.
- Boothby, J.T., Jasper, D.E. & Thomas C.B. (1987). Experimental intramammary inoculation with *Mycoplasma bovis* in vaccinated and unvaccinated cows: effect on local and systemic antibody response. *Can. J. Vet. Res.*, 51(1), 121-125.
- Boughton, E. (1979). *Mycoplasma bovis* mastitis. *Vet. Bull.* 49, 377-387.

- Bramley, A.J. & Dodd, F.H. (1984). Reviews of the progress of dairy science: mastitis control - progress and prospects. *J. Dairy Res.*, 51, 481-512.
- Bramley, J. (1992). Identifying mastitis problems and strategies for control. *Proceedings of the 31st National Mastitis Council, Inc.*: Arlington, VA, pp. 5-14.
- Brank, M., Le Grand, D., Poumarat, F., Bezille, P., Rosengarten, R. & Citti, C. (1999). Development of a recombinant antigen for antibody based diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6, 861-867.
- Bray, D.R., Shearer J.K., Donovan C.A. & Reed, P.A. (1997). Approaches to achieving and maintaining a herd free of *mycoplasma* mastitis: Madison, WI, pp. 132-137.
- Brice, N., Finlay D., Bryson D.G. , Henderson J. , McConnell, W. & Ball, H.J. (2000). Isolation of *Mycoplasma bovis* from cattle in Northern Ireland, 1993 to 1998. *Veterinary Record*, 146, 643-644.
- Brown, M.B., Shearer, J.K. & Elvinger, F. (1990). *Mycoplasmal* mastitis in a dairy herd. *J Am Vet Med Assoc*, 196, 1097-1101.
- Buchvarova, Y. & Vesselinova, A. (1989). On the aetiopathogenesis of *Mycoplasma pneumonia* in calves. *Archiv fur Experimentelle Veterinarmedizin*, 43, 685-689.
- Bushnell, R.B. (1984). *Mycoplasma* mastitis. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract*, 6, 301-312.
- Byrne, W.J., Ball, H.J., Brice, N., McCormack, R., Baker, S.E., Ayling, R.D. & Nicholas, R.A.J. (2000). Application of an indirect ELISA to milk samples to identify cows with *Mycoplasma bovis* mastitis. *Veterinary Record*, 146, 368-369.
- Byrne, W.J., McCormack, R., Brice, N., Markey, B. & Ball, H.J. (2001). Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical samples in the Republic of Ireland. *Veterinary Record*, 148, 331-333.
- Cai, H.Y., Rogers, P.B., Parker, L. & Prescott, J.F. (2005). Development of a real-time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples. *J. Vet. Diagn. Invest*, 17, 537-545.

- Calloway, C.D., Schultz, L.G., Chigerwe, M., Larson, R.L., Youngquist, R.S. & Steevens, B.J. (2008). Determination of serologic and colostral response in late-gestation cows vaccinated with a *Mycoplasma bovis* bacterin. *Am. J. Res.*, 69(7), 912-915.
- Cooper A.C., Fuller J.R., Fuller M.K., Whittlestone P. & Wise D.R. (1993). In vitro activity of danofloxacin, tylosin and oxytetracycline against *mycoplasmas* of veterinary importance. *Res. Vet. Sci.*, 54, 329-334.
- Dyer, N., Hansen-Lardy, L., Krogh, D., Schaan, L. & Schamber, E. (2008). An outbreak of chronic pneumonia and polyarthritis syndrome caused by *Mycoplasma bovis* in feedlot bison (*Bison bison*). *J Vet Diagn Invest* 20, 369-371.
- EMA (2006). *Reflection paper on the use of fluoroquinolones in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health*: London, 18 January. Accessed on: Mar. 7, 2009, available at: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/srwp/18465105en.pdf>.
- Faculty of Veterinary Medicine of Utrecht (2003). *Guide to Veterinary Antimicrobial Therapy* (4th edition). Boxmeer: Alfasan Nederland BV, Woerden.
- Farnsworth, R. J. (1993). Microbiologic examination of bulk tank milk. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 9, 469-474.
- Feenstra, A., Madsen E.B., Friis N.F., Meyling A. & Ahrens, P. (1991). A field study of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. *J. Vet. Med. B.*, 38, 195-202.
- Filioussis, G., Christodouloupolos, G., Thatcher, A., Petridou, V. & Bourtzi-Chatzopoulou E. (2007). Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical mastitis cases in Northern Greece. *The Veterinary Journal*, 173, 215-218.
- Finch, J.M. & Howard, C.J. (1990). Inhibitory effect of *Mycoplasma dispar* and *Mycoplasma bovis* on bovine immune responses in vitro. *Zentralbl. Bakteri.*, Suppl. 20, 563-569.
- Foddai, A., Idini, G., Fusco, M., Rosa, N., Fé, C. de la, Zinellu, S., Corona, L. & Tola, S. (2005). Rapid differential diagnosis of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* based on a multiplex-PCR and a PCR-RFLP. *Molecular and Cellular Probes*, 19, 207-212.
- Foster, P.A., Naylor, R.D., Howie, N.M., Nicholas, R.A.J. & Ayling R.D. (2009). *Mycoplasma bovis* and otitis in dairy calves in the United Kingdom. *The Veterinary Journal*, 179(3), 455-457.

- Fox, L.K., Hancock, D.D., Mickelson, A. & Britten, A. (2003). Bulk tank milk analysis: factors associated with appearance of *Mycoplasma* sp. in milk. *J. Vet. Med.*, B 50, 235-240.
- Fox, L.K., Kirk, J. H. & Britten A. (2005). *Mycoplasma* mastitis: A Review of Transmission and Control. *J. Vet. Med.*, B 52, 153-160.
- Fox, L., Schneider, C. & Stipkovits L. (2008). *Mycoplasma* Diseases in the Bovine: Diagnosis, Prevention and More [abstract]. In F. Tiborné, S. Judit & V. Miklós (Eds.) *Oral and Poster Abstracts of the XXV Jubilee World Buiatrics Congress, 6-11 July 2008*, Vol. 130, Supplement II, pp.321, Budaapest, Hungary: Hungarian Veterinary Journal.
- Francoz, D., Fortin, M., Fecteau, G. & Messier, S. (2005). Determination of *Mycoplasma bovis* susceptibilities against six antimicrobial agents using the E-test method. *Veterinary Microbiology*, 105, 57-64.
- Frey, J., Subramaniam, S., Bergonier, D. & Nicolet, J. (1999). DNA repair genes *uvrC* as genetic targets for discrimination of closely related *Mycoplasmas*. In: Stipkovits, L., Rosengarten, R., Frey, J. (Eds.), *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, vol. 3. European Commission: Brussels, pp. 40-43.
- Froyman, R. & Perzo, J.F. (2005). *Antimicrobial sensitivity of field strains of Mycoplasma bovis recently isolated from beef cattle in France*. Bayer Animal Health: France, study 2005-074.
- Froyman, R., Boda, C., Rizet, C., Valongnes, A., Brunner, N., Liège, P. & Navetat, H. (2008). Short-duration antimicrobial treatment of bovine respiratory disease with enrofloxacin, florfenicol and cefquinome [abstract]. *Extended Summaries 2nd International Bayer Cattle Symposium and Oral and Poster Presentations at the 25th World Buiatrics Congress: Budapest, Hungary, 5th July 2008*, pp. 65.
- Gagea, M.I., Bateman, K.G., Shanahan, R.A., Dreumel, T.V., McEwen, B.J., Carman, S., Archambault M. & Caswell, J.L. (2006a). Naturally occurring *Mycoplasma bovis* - associated pneumonia and polyarthritis in feedlot beef calves. *J Vet Diagn Invest*, 18, 29-40.
- Gagea, M.I., Bateman, K.G., Shanahan, R.A., Dreumel, T.V., McEwen, B.J., Carman, S., Archambault, M. & Caswell, J.L. (2006b). Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. *J Vet Diagn Invest*, 18, 18-28.

- Gevaert, D. & Passchyn, P. (2008). *Mycoplasma bovis* sanitation program in a dairy herd using baytril 100/Max and biosecurity measures [abstract]. In F. Tiborné, S. Judit & V. Miklós (Eds.) *Oral and Poster Abstracts of the XXV Jubilee World Buiatrics Congress, 6-11 July 2008*, Vol. 130, Supplement II, pp.85, Budaapest, Hungary: Hungarian Veterinary Journal.
- Gevaert D., Passchyn, P. & Theys, H. (2008). Elisa antibodies to study the spread of *Mycoplasma bovis* in 2 Belgian herds[abstract]. In F. Tiborné, S. Judit & V. Miklós (Eds.) *Oral and Poster Abstracts of the XXV Jubilee World Buiatrics Congress, 6-11 July 2008*, Vol. 130, Supplement II, pp.162, Budaapest, Hungary: Hungarian Veterinary Journal.
- Gevaert, D. (2006). The importance of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease. *Tijdschr Diergeneeskde*, 131, 124-126.
- Ghadersohi, A., Hirst, R.G., Forbes-Faulkener, J. & Coelen R.J. (1999). Preliminary studies on the prevalence of *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy cattle in Australia. *Veterinary Microbiology*, 65, 185-194.
- Ghadersohi, A., Fayazi, Z. & Hirst, R.G. (2005). Development of a monoclonal blocking ELISA for the detection of antibody to *Mycoplasma bovis* in dairy cattle and comparison to detection by PCR. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 104, 183-193.
- Gonçalves, M.R. (1990). Micoplasmas isolados do tracto genital dos bovinos, possíveis implicações na viabilidade dos espermatozoides. *Repositório de Trabalhos do L.N.I.V.*, XXII, 79.
- Gonzalez, R.N., Jayaro, B.M., Oliver, S.P. & Sears, P.M. (1993). Pneumonia, Arthritis, and Mastitis in Dairy Cows Due to *Mycoplasma bovis*. *Proceeding of The National Mastitis Council*: Arlington, VA, pp. 178-186.
- Gonzalez, R.N. & Wilson, D.J. (2003). *Mycoplasma* mastitis in dairy herds. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 19, 199-221.
- Gourlay, R.N., Thomas, L.H. & Wyld, S.G. (1989). Increased severity of calf pneumonia associated with the appearance of *Mycoplasma bovis* in a rearing herd. *Veterinary Record*, 124, 420-422.
- Gunning, R.F. & Shepherd, P.A. (1996). Outbreak of bovine *Mycoplasma bovis* mastitis. *Veterinary Record*, 139, 23-24.
- Haines, D.M., Martin, K.M., Clark, E.G., Jim, G.K. & Janzen, E.D. (2001). The immunohistochemical detection of feedlot cattle with chronic unresponsive respiratory disease and/or arthritis. *Canadian Veterinary Journal*, 42, 857-860.

- Hale, H.H., Helmboldt, C.F., Plastring, W.N. & Stula, E.F. (1962). Bovine mastitis caused by *Mycoplasma* species. *Cornell Veterinarian*, 52, 582-591.
- Hannan, P.C., Windsor, G.D., de Jong, A., Schmeer, N. & Stegemann, M. (1997). Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic *Mycoplasmas* to fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 2037-2040.
- Hannan, P.C. (2000). Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary *Mycoplasma* species, International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology. *Vet. Res.*, 31(4), 373-395.
- Hawkins, L. (2006). Bovine Respiratory disease: comparative therapeutic experiences. *Extended Summaries 1st International Bayer Cattle Symposium and Poster Presentations at the 24th World Buiatrics Congress: Nice, France, 15 th October 2006*, pp. 44-46.
- Heller, M., Berthold, E., Pfützner H., Leirer, R. & Sachse, K. (1993). Antigen capture ELISA using a monoclonal antibody for the detection of *Mycoplasma bovis* in milk. *Vet. Micro.*, 37, 127-133.
- Hirsh, D.C. (2000). *Mycoplasmas* In: J.F. Prescott, J.D. Baggot and R.D. Walker, (Eds). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*: Iowa State University Press, Ames, pp. 466-468.
- Hogan, J. S., Gonzalez, R. N., Harmon, R. J., Nickerson, S. C., Oliver, S. P., Pankey, J. W. & K. L., Smith (1999). *National Mastitis Council Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*: National Mastitis Council, Madison, WI, pp.151-155.
- Hotzel, H., Sachse, K. & Pfutzner, H., (1996). Rapid detection of *Mycoplasma bovis* in milk samples and nasal swabs using the polymerase chain reaction. *Journal of Applied Bacteriology*, 80, 505-510.
- Houlihan, M.G., Veenstra, B., Christian M.K., Nicholas, R.A.J. & Ayling, R. (2007). Mastitis and arthritis in two dairy herds caused by *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Record*, 160, 126-127.
- Howard, C.J., Stott, E.J., Thomas, L.H., Gourlay, R.N. & Taylor, G., (1987). Protection against respiratory disease in calves induced by vaccines containing respiratory syncytial virus, parinfluenza type 3 virus, *Mycoplasma bovis* and *M. dispar*. *Veterinary Record*, 121, 372-376.
- Infante, F., Infante Jr, F. & Flores-Gutierrez, G.H. (2002). Improved immunobinding test using monoclonal antibodies for detection of *Mycoplasma bovis* in milk.. *Can. J. Vet. Res.*, 66, 444-446.

- Instituto Nacional de Estatística (2008). *Estatísticas Agrícolas 2007*. Lisboa, Portugal: INE, I.P..
- Jackson, G. & Boughton, E. (1991). A mild outbreak of bovine mastitis associated with *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Record*, 129, 444-446.
- Jain, N.C., Jasper, D.E. & Dellinger, J.D. (1969). Serologic response of cows to *mycoplasmas* under experimental and field conditions. *Am. J. Vet. Res.*, 30, 733-742.
- Jasper, D.E., Dellinger, J.D., Rollins, M. H. & Hakanson, H.D. (1979). Prevalence of *mycoplasma* bovine mastitis in California. *J. Vet. Res.* 40, 1043-1047.
- Jasper, D.E. (1981). Bovine *mycoplasma* mastitis. *Adv. Vet. Sci. Comp Med.*, 25, 121-159.
- Jungi, T.W., Krampe, M., Sileghem, M., Griot, C. & Nicolet, J. (1996). Differential and strain-specific triggering of bovine alveolar macrophage effector functions by *mycoplasmas*. *Microbial Pathogenesis*, 21, 487-498.
- Jurmanova, K. & Hajkova, M. (1983). Further evidence of the involvement of *Mycoplasma californicum* in bovine mastitis in Europe. *Veterinary Record*, 112, 608.
- Kauf, A.C., Rosenbusch, R.F., Paape, M.J. & Bannerman, D.D. (2007). Innate immune response to intramammary *Mycoplasma bovis* infection. *J Dairy Sci.*, 90 (7), 3336-48.
- Khodakaram-Tafti, A. & López, A. (2004). Immunohistopathological findings in the lungs of calves naturally infected with *Mycoplasma bovis*. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.*, 51(1), 10.
- Kirby, F.D. & Nicholas, R.A.J. (1996). Isolation of *Mycoplasma bovis* from bullocks eyes. *Veterinary Record*, 138, 552.
- Kirk, J.H. & Lauerman, L.H. (1994). *Mycoplasma* mastitis in dairy cows. *The Compendium*, 16, 541-558.
- Kirk, J.H., Glenn, K., Ruiz, L. & Smith, E. (1997). Epidemiologic analysis of *Mycoplasma* spp. isolated from bulk-tank milk samples obtained from dairy herds that were members of milk cooperative. *J Am Vet Med Assoc*, 211, 1036-1038.

- Kreusel, S., Bocklisch, H., Pfützner, H., Brys, A., Leirer, R. & Ziegenhals, U. (1989). Experimentelle infektionen von bullen mit *Mycoplasma bovis* und *Mycoplasma bovis genitalium*. *Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin*, 43, 705-712.
- Kunkel, J.R. (1985). Isolation of *Mycoplasma bovis* from bulk milk. *Cornell Vet.*, 75, 398-400.
- Lamm, C.G., Munson, L., Thurmond, M.C., Barr, B.C. & George, L.W. (2004). *Mycoplasma* otitis in California calves. *Diagn. Invest.*, 16, 397-402.
- Le Grand, D., Phillippe, S., Cavavalas, D., Bezille, P. & Poumarat, F. (2001). Prevalence of *Mycoplasma bovis* infection in France. In: Poveda J.B., Fernandez A., Frey J., Johnansson, K.E. (Eds.), *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, vol. 5 European Commission: Brussels, pp. 106-109.
- Machado, M. & Atalaia, V. (1987). Notas sobre o isolamento de *Mycoplasma bovis* e de *Mycoplasma* serogrupo 7 leach (pg.50), a partir do sêmen de bovinos. *Repositório de Trabalhos do L.N.I.V.*, XIX, 61.
- Mackie, D.P., Finlay, D., Brice, N. & Ball, H.J. (2000). Mixed *Mycoplasma* mastitis outbreak in a dairy herd. *Veterinary Record*, 147, 335-336.
- Madoff, S., Pixley, B.Q., DelGiudice, R.A & Moellering, R.C. (1979). Isolation of *Mycoplasma bovis* from a patient with systemic illness. *J Clin Microbiol*, 9(6), 709-711.
- Maeda, T., Shibahara, T., Kimura, K., Wada, Y., Sato, K., Imada, Y., Ishikawa, Y. & Kadota, K. (2003). *Mycoplasma bovis* - associated suppurative otitis media and Pneumonia in Bull Calves. *J. Comp. Path.*, 129, 100-110.
- Maillard, R., Assié, S. & Douart, A. (2006). Respiratory Disease in adult cattle. *Proceedings of the XXIV World Buiatrics Congress: Nice, France, 15-19 October 2006*, pp. 398-411.
- Marques, L.M., Buzinhani, M., Oliveira, R.C., Yamaguti, M., Ferreira, J.B., Neto, R.L. & Timenetsky, J. (2007). Prevalence of mycoplasmas in the respiratory tracts of calves in Brazil. *Veterinary Record*, 161, 699-700.
- Maunsell, F.P., Donovan, G.A., Risco, C. & Brown, M.B. (2009). Field evaluation of a *Mycoplasma bovis* bacterin in young dairy calves. *Vaccine*, 27(21), 2781-2788.

- Miles, R.J., Wadher, C.L., Henderson, C.L. & Mohan, K. (1988). Increased yields of *Mycoplasma* spp. in the presence of pyruvate. *Letters in Applied Microbiology*, 7, 149-151.
- Nagatomo, H., Shimizu, T., Higashiyama, Y., Yano, Y., Kuroki, H. & Hamana, K. (1996). Antibody response to *Mycoplasma bovis* of calves introduced to a farm contaminated with the organism. *J. Vet. Med. Sci.*, 58, 919-920.
- Nagatomo, H., Takegahara, Y., Sonoda, T., Yamaguchi, A., Uemura, R., Hagiwara, S. & Sueyoshi, M. (2001). Comparative studies of the persistence of animal mycoplasmas under different environmental conditions. *Veterinary Microbiology*, 82, 223-232.
- Nicholas, R.A.J. (1997). The other *M. bovis*: *Mycoplasma bovis*. *State Veterinary Journal*, 7, 399-402.
- Nicholas, R.A.J. & Baker, S.E. (1998). Recovery of mycoplasmas from animals. In: Miles, R.J., Nicholas, R.A.J. (Eds.), *Mycoplasma Protocols*. Humana Press: Totowa, USA, pp. 37-44.
- Nicholas, R.A.J., Baker, S., Ayling, R.D. & Stipkovits, L. (2000). *Mycoplasma* infections in growing cattle. *Cattle Practice*, 8, 115-118.
- Nicholas, R.A.J., Wood, E., Baker, S. & Ayling, R.D. (2001). *Mycoplasmas* isolated from ruminants in Britain 1995-2000. In: Poveda J.B., Fernandez A., Frey J., Johnansson K.E. (Eds.), *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, vol. 5 European Commission: Brussels, pp. 116-120.
- Nicholas, R.A.J., Ayling, R.D. & Stipkovits, L.D. (2002). An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*: clinical, cultural, serological and pathological findings. *Vaccine*, 20, 3569-3575.
- Nicholas, R.A.J. & Ayling R.D. (2003). *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Research in Veterinary Science*, 74, 105-112.
- Nicholas, R.A.J., Ayling, R.D., Woodger, N., Wessells, M.E. & Houlihan, M.G. (2006). *Mycoplasmas* in adult cattle: Bugs worth bothering about?. *Irish Veterinary Journal*, 59(10), 568-572.
- Nicholas, R., Raedelli, E., Luini M., Loria, G. & Ayling, R. (2008). Prevalence and Control of *Mycoplasma bovis* in Europe [abstract]. In F. Tiborné, S. Judit & V. Miklós (Eds.) *Oral and Poster Abstracts of the XXV Jubilee World Buiatrics Congress, 6-11 July 2008*, Vol. 130, Supplement II, pp.329, Budaapest, Hungary: Hungarian Veterinary Journal.

- Nicholas, R.A.J., Ayling, R.D. & McAuliffe, L. (2009). Vaccines for *Mycoplasma* diseases in animals and man. *J. Comp. Pathol.*, 140(2-3), 85-96.
- Noordhuizen, J.P.T.M., Frankena, K., Thrusfield, M.V. & Graat, E.A.M. (2001). *Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology* (2nd edition). Wageningen: Wageningen Pers.
- O'Farrell, K., Dillon, P., Mee, J., Crosse, S., Nolan, M., Byrne, N., Reidy, M., Flynn, F. & Condon, T. (2001). Strategy for restocking Moorepark after depopulation following BSE. *Irish Veterinary Journal*, 54, 70-75.
- Petit, T., Spargser, J., Aurich, J. & Rosengarten, R. (2008). Prevalence of Chlamydiaceae and Mollicutes on the genital mucosa and serological findings in dairy cattle. *Veterinary Microbiology*, 127, 325-333.
- Pfützner, H.B. & Schimmel, D. (1985). Demonstration of *Mycoplasma bovis* in descendants of cows affected with *M. bovis* mastitis and its epidemiological significance. *Zbl. Vet. Med.*, B. 32, 265-279.
- Pfützner, H. (1990). Epizootiology of the *Mycoplasma bovis* infection of cattle. *Zentralblatt für Bakteriologie Supplement*, 20, 394-399.
- Pfützner, H. & Sachse, K. (1996). *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle.. *Rev Sci Tech.*, 15(4), 1477-94.
- Pinho, L., Maia, I., Canada, N., Azevedo, C., Machado, M., Silva, E., Thompson, G. & Carvalheira, J. (2008). *Mycoplasma bovis* outbreak in a dairy herd: consequences on production and reproduction [abstract]. In F. Tiborné, S. Judit & V. Miklós (Eds.) *Oral and Poster Abstracts of the XXV Jubilee World Buiatrics Congress, 6-11 July 2008*, Vol. 130, Supplement II, pp.329, Budapest, Hungary: Hungarian Veterinary Journal.
- Pinnow, C.C., Butler, J.A., Sachse, K., Hotzel, H., Timms, L.L. & Rosenbusch, R.F. (2001). Detection of *Mycoplasma bovis* in preservative treated milk samples. *Journal of Dairy Science*, 84, 1640-1645.
- Pitcher, D.G. & Nicholas, R.A.J. (2005). *Mycoplasma* host specificity: Fact or fiction?. *The Veterinarian Journal*, 170, 300-306.
- Poumarat, F. & Martel, J.L. (1989). Antibiosensibilité in vitro des souches françaises de *Mycoplasma bovis*. *Ann. Rec. Vét.*, 20, 145-152.

- Poumarat, F., Le Grand, D. & Bergonier, D. (1996). Propriétés générales des mycoplasmes et hypervariabilité antigénique. *Point. Vet.*, 28, 761-767.
- Poumarat, F., Le Grand, D., Phillipe, S., Calavas, D., Schelcher, F., Cabanie, P., Tessier, P. & Navetat H. (2001). Efficacy of spectinomycin against *Mycoplasma bovis* induced pneumonia in conventionally reared calves. *Veterinary Microbiology*, 80, 23-25.
- Poveda, J.B. & Nicholas, R.A.J. (1998). Serological identification of mycoplasmas by growth and metabolism inhibition tests. In: Miles, R.A.J. Nicholas, R.D. Ayling / Research in Veterinary Science 74 (2003). R.J., Nicholas, R.A.J. (Eds.), *Mycoplasma* Protocols. Humana Press: Totowa, USA, pp. 105-112.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. (2008). *Microbiology* (7th edition). New York: McGraw-Hill.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. & Leonard, F.C. (2005). *Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias*. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A..
- Radaelli, E., Luini, M., Loria, G.R., Nicholas, R.A.J. & Scanziani, E. (2008). Bacteriological, serological, pathological and immunohistochemical studies of *Mycoplasma bovis* respiratory infection in veal calves and adult cattle at slaughter. *Research in Veterinary Science*, 85, 282-290.
- Radostitis, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. & Constable, P.D. (2007). Diseases associated with bacteria - III. Chapter 18. In O.M. Radostitis (Eds.), *Veterinary Medicine - A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats* (10th edition).(pp.923-946). New York: Elsevier Science Health Science Div..
- Razin, S., Yogev, D. & Naot, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Micro. Mol. Biol. Ver.*, 62, 1094-1156.
- Rebhun, W.C., Guard, C. & Richards, C.M. (1995). *Respiratory diseases*. In: Disease of Dairy Cattle. Williams and Wilkins. Baltimore USA: pp. 79-80.
- Reeve-Johnson, L. (1999). The impact of *Mycoplasma* infections in respiratory disease in cattle in Europe. In: Stipkovits, L., Rosengarten, R., Frey, J. (Eds.), *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, vol. 3: European Commission, Brussels, pp. 18-31.
- Rhoda, D. A. (2000). How we tackled a *Mycoplasma* problem. *Hoard's Dairyman*, 766-767.

- Rifatbegovic, M., Assunção, P., Poveda, J.B. & Pasic, S. (2007). Isolation of *Mycoplasma bovis* from the respiratory tract of cattle in Bosnia and Herzegovina. *Veterinary Record*, 160, 484-485.
- Rifatbegovic, M., Assunção, P. & Pasic, S. (2009). Protein and antigenic profile among *Mycoplasma bovis* field strains isolated in Bosnia Herzegovina. *Acta Vet.*, 78, 151-154.
- Rodriguez, F., Bryson, D.G., Ball, H.J. & Forster, F. (1996). Pathological and immunohistochemical studies of natural and experimental *Mycoplasma bovis* pneumonia in calves. *Journal of Comparative Pathology*, 115, 151-162.
- Rosengarten, R., Behrens, A., Stetefeld, A., Heller, M., Ahrens, M., Sache, K., Yogev, D. & Kirchoff, H. (1994). Antigen heterogeneity among isolates of *Mycoplasma bovis* is generated by high-frequency variation of diverse membrane surface proteins. *Infect. Immun*, 62, 5066-5074.
- Rosengarten, R. & Citti, C. (1999). The role of ruminant mycoplasmas in systemic infection. In: Stipkovits, L., Rosengarten, R., Frey, J. (Eds.), *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, vol. 3.. European Commission: Brussels, pp. 14-17.
- Ross, R.F. (1993). *Mycoplasmas*-animal pathogens. In: Kahane, I., Adoni, A. (Eds.), *Rapid diagnosis of mycoplasmas*. Plenum Press, New York, USA, pp. 69-110.
- Ruhnke, H.L., Thawley, D. & Nelson, F.C. (1976). Bovine mastitis in Ontario due to *Mycoplasma agalactiae*, subsp. *bovis*. *Can. J. Comp. Med.*, 40, 142-148.
- Shahriar, F.M., Clark, E.G., Janzen, E., West, K. & Wobeser, G. (2002). Coinfection with bovine viral diarrhoea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. *The Canadian Veterinary Journal*, 43, 863-868.
- Stipkovits, L., Ripley, P.H., Varga, J. & Palfi, V. (2001). Use of valnemulin in the control of *Mycoplasma bovis* infection under field conditions. *Veterinary Record*, 148, 399-402.
- Stipkovits, L. & Szathmary, S. (2008). *Mycoplasma bovis* infection of calves [abstract]. In F. Tiborné, S. Judit & V. Miklós (Eds.) *Oral and Poster Abstracts of the XXV Jubilee World Buiatrics Congress, 6-11 July 2008*, Vol. 130, Supplement II, pp.321, Budapest, Hungary: Hungarian Veterinary Journal.
- Subramaniam, S., Bergonier, D., Poumarat, F., Capaul, S., Schlatter, Y., Nicolet, J. & Frey, J. (1998). Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma*

- agalactiae* based on the *uvrC* genes by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 12(3), 161-169.
- ter Laak, E.A., Noordergraaf, J.H. & Boomsluiter, E. (1992a). The nasal mycoplasmal flora of healthy calves and cows. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 39, 610-616.
- ter Laak, E.A., Noordergraaf, J.H. & Dieltjes, R.P.J.W. (1992b). Prevalence of *Mycoplasmas* in the respiratory tracts of pneumonic calves. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 39, 553-562.
- ter Laak, E.A., Noordergraaf, J.H. & Verschure, M.H. (1993). Susceptibilities of *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar* and *Ureaplasma diversum* strains to antimicrobial agents *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37, 317-321.
- Thomas, C. B., Willeberg, P. & Jasper, D. E. (1981). Case-control study of bovine *Mycoplasma* mastitis in California. *Am. J. Vet. Res.*, 42, 511-515.
- Thomas, L.H., Howard, C.J., Stott, E.J. & Parsons, K.A. (1986). *Mycoplasma bovis* infections in gnotobiotic calves and combined infection with respiratory syncytial virus. *Veterinary Pathology*, 23, 571-578.
- Thomas, C.B., Van Ess, P., Wolfgram, L.J., Riebe, J., Sharp, P. & Schultz, R.D. (1991). Adherence to bovine neutrophils and suppression of neutrophil chemiluminescence by *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 27, 365-381.
- Thomas, A., Dizier, I., Trolin, A., Mainil, J. & Linden, A. (2002). Comparison of sampling procedures for isolating pulmonary mycoplasmas in cattle. *Veterinary Research Communications*, 26, 333-339.
- Thomas, A., Sachse, K., Farnir, F., Dizier, I., Maini, J. & Linden, A. (2003). Adherence of *Mycoplasma bovis* to bovine bronchial epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 34, 141-148.
- Tschopp, R., Bonnemain, P., Nicolet, J. & Burnens, A. (2001). Epidemiological study of risk factors associated with *Mycoplasma bovis* infections in fattening calves. *Archiv für Tierheilkunde*, 143, 461-467.
- Urbaneck, D., Leibig, F., Forbrig, T.H. & Stache, B. (2000). Erfahrungsbericht zur Anwendung bestandsspezifischer Impfstoffe gegen respiratorische Infektionen mit Beteiligung von *Mycoplasma bovis* in einem Mastriendergrosstbestand. *Der praktische Tierarzt*, 81, 756-763.

- Vanden Bush, T.J. & Rosenbusch, R.F. (2002). *Mycoplasma bovis* induces apoptosis of bovine lymphocytes. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 32, 97-103.
- Vanden Bush, T.J. & Rosenbusch, R.F. (2003). Characterization of the immune response to *Mycoplasma bovis* lung infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 94, 23-33.
- Wendt, K., Lenzke, J. & Petrov, P. (2002). Treatment of *Mycoplasma* mastitis in cows with enrofloxacin (Baytril). *Proceedings of the XXII World Buiatrics Congress: Hannover, Germany, 18-23 August*, p. 141-142.
- Wiggins, M.C., Woolums, A.R., Sanchez, S., Hurley, D.J., Cole, D.J., Ensley, D.T. & Pence, M.E. (2007). Prevalence of *Mycoplasma bovis* in backgrounding and stocker cattle operations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 230(10), 1514-8.
- Wilson, D.J., Skirpstunas, R.T., Trujillo, J.D., Cavender, K.B., Bagley, C.V. & Harding, R.L. (2007). Unusual history and initial clinical signs of *Mycoplasma bovis* mastitis and arthritis in first-lactation cows in a closed commercial dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 230(10), 1519-23.
- Woldehiwet, Z., Mamache, B. & Rowan, T.G. (1990). Effects of age, environmental temperature and relative humidity on the colonization of the nose and trachea of calves by *Mycoplasma* spp.. *Br. Vet. J.*, 146, 419-424.

6) Anexos

Anexo 1. Questionário epidemiológico

QUESTIONÁRIO

Micoplasmose bovina: serologia aplicada ao diagnóstico em bovinos

Data: ____/____/____

Nº de entrada _____

OPP: _____

Identificação da

exploração: _____

Nome _____ do

Proprietário: _____

Freguesia:

_____ Concelho: _____ Código

Postal: _____

Veterinário

responsável: _____

1 - Número de Bovinos existentes na exploração:

Total _____

Vacas _____

Novilhas _____

Vitelos/as _____

Machos _____

1.1 - Existem outra(s) espécies na exploração?

Sim ☐

Não ☐

1.1.1 Quais:

Ovinos ☐ Caprinos ☐ Suínos ☐ Aves ☐ Outras: _____

1.1.2 Caso existam outra(s) espécies, há partilha de espaços?

Sim ☐

Não ☐

2 - Há partilha de espaços com bovinos de outras explorações:

Sim ☐

Não ☐

3 - Tipo de exploração:

Bovinos leiteiros ☐

Bovinos de Carne ☐

Engorda ☐

4 - Regime de exploração:

Exploração intensiva ☐

Semi-intensiva ☐

Extensiva ☐

5- A reposição do efectivo é feita com animais nascidos na exploração?

Sim ☐

Não ☐

6- São comprados animais?

Sim ☐

Não ☐

7- Onde costumam ser comprados animais para a exploração?

Mercados/Feiras ☐ Negociantes ☐ Importação ☐ Outra _____

8 - Vacinas aplicadas no último ano:

Data	Vacina aplicada (Grupo)	Animais vacinados (todos ou apenas grupos de animais?)

9- Na exploração ocorreram nos últimos dois anos (assinalar as alterações observadas):

Patologia Respiratória

☐

Artrites

☐

Queratoconjuntivites

☐

Aumento da frequência de mamites

☐

Redução da produção leiteira

☐

Alterações nos parâmetros reprodutivos

☐

Antibioterapia sem cura clínica

☐

Anexo 2. Resultados dos testes de ELISA na OPP de Vila do Conde, OPP de Acripinhal e OPP de Campo Branco.

Tabela 25. Resultados dos testes de ELISA por exploração, na OPP de Vila do Conde (por ordem decrescente de % de animais Positivos).

Nº animais	Exploração	1	2	3	4	Positivo	Negativo	Total	% Positivos	% Negativos	% de 1	% de 2	% de 3	% de 4
50	BDC41	14	13	2		29		29	100,0%	0,0%	48,3%	44,8%	6,9%	0,0%
132	BDE33	1	2	1		4		4	100,0%	0,0%	25,0%	50,0%	25,0%	0,0%
2	BDS65	1		1		2		2	100,0%	0,0%	50,0%	0,0%	50,0%	0,0%
24	BDJ71	9				9	1	10	90,0%	10,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
212	BDH70	39	6			45	7	52	86,5%	13,5%	86,7%	13,3%	0,0%	0,0%
106	BDS69	31	4			35	6	41	85,4%	14,6%	88,6%	11,4%	0,0%	0,0%
110	BDH36	20	12	1		33	9	42	78,6%	21,4%	60,6%	36,4%	0,0%	3,0%
51	BDH11	21	2			23	7	30	76,7%	23,3%	91,3%	8,7%	0,0%	0,0%
36	BDC39	16	2			18	6	24	75,0%	25,0%	88,9%	11,1%	0,0%	0,0%
146	BDB53	33	2			35	13	48	72,9%	27,1%	94,3%	5,7%	0,0%	0,0%
172	BDH43	32	4			36	14	50	72,0%	28,0%	88,9%	11,1%	0,0%	0,0%
92	BDS49	24	4			28	11	39	71,8%	28,2%	85,7%	14,3%	0,0%	0,0%
90	BDH53	26	2			28	12	40	70,0%	30,0%	92,9%	7,1%	0,0%	0,0%
156	BDS84	23	10			33	15	48	68,8%	31,3%	69,7%	30,3%	0,0%	0,0%
80	BDS43	25				25	12	37	67,6%	32,4%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
11	BDF94	6				6	3	9	66,7%	33,3%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
65	BDH62	22	2			24	12	36	66,7%	33,3%	91,7%	8,3%	0,0%	0,0%
113	BDH30	25	2	1		28	15	43	65,1%	34,9%	89,3%	7,1%	3,6%	0,0%
135	BDF39	25	3			28	18	46	60,9%	39,1%	89,3%	10,7%	0,0%	0,0%
116	BDF45	20	4	1		25	18	43	58,1%	41,9%	80,0%	16,0%	4,0%	0,0%
90	BDL85	21	1	1		23	17	40	57,5%	42,5%	91,3%	4,3%	4,3%	0,0%
12	1BDF69	5	1			6	5	11	54,5%	45,5%	83,3%	16,7%	0,0%	0,0%
150	003280BDE30	25	1			26	22	48	54,2%	45,8%	96,2%	3,8%	0,0%	0,0%
116	BDS38	21	2			23	20	43	53,5%	46,5%	91,3%	8,7%	0,0%	0,0%
22	9BDF59	7	2			9	8	17	52,9%	47,1%	77,8%	22,2%	0,0%	0,0%
149	BDC80	24	1			25	23	48	52,1%	47,9%	96,0%	4,0%	0,0%	0,0%
137	BDS35	24	1			25	23	48	52,1%	47,9%	96,0%	4,0%	0,0%	0,0%
209	BDH86	25	3	1		29	28	57	50,9%	49,1%	86,2%	10,3%	3,4%	0,0%
45	BDC45	14				14	14	28	50,0%	50,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
40	BDE29	12	1			13	13	26	50,0%	50,0%	92,3%	7,7%	0,0%	0,0%
63	BDH66	16	2			18	18	36	50,0%	50,0%	88,9%	11,1%	0,0%	0,0%
64	BDS27	13	3			16	17	33	48,5%	51,5%	81,3%	18,8%	0,0%	0,0%
144	001480BDB63	19	3			22	25	47	46,8%	53,2%	86,4%	13,6%	0,0%	0,0%
27	BDE62	8		1		9	11	20	45,0%	55,0%	88,9%	0,0%	0,0%	11,1%
72	BDB82	13	2			15	20	35	42,9%	57,1%	86,7%	13,3%	0,0%	0,0%
95	BDB88	16	1			17	23	40	42,5%	57,5%	94,1%	5,9%	0,0%	0,0%
56	BDB32	13	2			15	21	36	41,7%	58,3%	86,7%	13,3%	0,0%	0,0%
34	BDL20	9	1			10	14	24	41,7%	58,3%	90,0%	10,0%	0,0%	0,0%
11	BDE50	3	3	1		7	10	17	41,2%	58,8%	42,9%	42,9%	14,3%	0,0%
6	BDC62	2				2	3	5	40,0%	60,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
61	BDL90	13	1			14	22	36	38,9%	61,1%	92,9%	7,1%	0,0%	0,0%
90	7BDD98	13	1	1		15	24	39	38,5%	61,5%	86,7%	6,7%	6,7%	0,0%
80	BDB90	13	1			14	23	37	37,8%	62,2%	92,9%	7,1%	0,0%	0,0%
35	BDD85	7	2			9	15	24	37,5%	62,5%	77,8%	22,2%	0,0%	0,0%
67	BDH56	11	1			12	22	34	35,3%	64,7%	91,7%	8,3%	0,0%	0,0%
154	003534BDT92	15	1			16	32	48	33,3%	66,7%	93,8%	6,3%	0,0%	0,0%
25	BDD97	6				6	13	19	31,6%	68,4%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
76	BDC67	10	1			11	25	36	30,6%	69,4%	90,9%	9,1%	0,0%	0,0%
60	BDE58	10				10	23	33	30,3%	69,7%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
91	BDS48	11				11	28	39	28,2%	71,8%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
122	BDF96	10	2			12	32	44	27,3%	72,7%	83,3%	16,7%	0,0%	0,0%
51	4BDE60	8				8	22	30	26,7%	73,3%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
6	BDJ44	1				1	3	4	25,0%	75,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
29	BDF58	4	1			5	16	21	23,8%	76,2%	80,0%	20,0%	0,0%	0,0%
23	BDC91	2	2			4	14	18	22,2%	77,8%	50,0%	50,0%	0,0%	0,0%
6	BDF41	1				1	4	5	20,0%	80,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
28	BDH07	4				4	16	20	20,0%	80,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
107	BDB85	8				8	34	42	19,0%	81,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
36	BDE19	4				4	20	24	16,7%	83,3%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
113	001226BDN63	3		2		5	38	43	11,6%	88,4%	60,0%	0,0%	40,0%	0,0%
2	BDE31					0	2	2	0,0%	100,0%	-	-	-	-
	Grand Total	541	85	10	5	631	297	928	68,0%	32,0%	85,7%	13,5%	1,6%	0,8%

Tabela 26. Resultados dos testes de ELISA por exploração, na OPP de Acripinhal (por ordem decrescente de % de animais Positivos).

Nº animais	Exploração	1	2	3	4	Positivos	Negativos	Total	% Positivos	% Negativos	% de 1	% de 2	% de 3	% de 4
87	Carnes Simões	26	3			29	3	32	91%	9%	90%	10%	0%	0%
139	Cardoso e Pequito	16	12	9	3	40	7	47	85%	15%	40%	30%	23%	8%
350	Manuel Rufino	24	14	3		41	16	57	72%	28%	59%	34%	7%	0%
	Somatório	0	17	12	7	69	10	79	87%	13%	0%	25%	17%	10%

Tabela 25. Resultados dos testes de ELISA por exploração, na OPP de Campo Branco (por ordem decrescente de % de animais Positivos).

Nº animais	Exploração	1	2	3	4	Positivos	Negativos	Total	% Positivos	% Negativos	% de 1	% de 2	% de 3	% de 4
2	Assunção Maria Neto	2				2		2	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
2	André Oliveira Quinta Gomes		1		1	2		2	100,0%	0,0%	0,0%	50,0%	0,0%	50,0%
13	Edmundo Afonso Martinho	8	3	2		13		13	100,0%	0,0%	61,5%	23,1%	15,4%	0,0%
6	José Guerreiro Martins	6				6		6	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
46	MIS (António José Sobral Banza)	24	3			27	1	28	96,4%	3,6%	88,9%	11,1%	0,0%	0,0%
172	Soc. Agrícola do Grupo Herdade Reis Dias	43	5			48	4	52	92,3%	7,7%	89,6%	10,4%	0,0%	0,0%
11	Manuel Ricardo Guerreiro	9	1			10	1	11	90,9%	9,1%	90,0%	10,0%	0,0%	0,0%
49	José de Palma Guerreiro	20	6	1		27	3	30	90,0%	10,0%	74,1%	22,2%	3,7%	0,0%
174	Nicasso Perez Gomes	47	6		1	54	6	60	90,0%	10,0%	87,0%	11,1%	0,0%	1,9%
83	Manuel Francisco Sequeira Salvador	31	4			35	5	40	87,5%	12,5%	88,6%	11,4%	0,0%	0,0%
23	Maria Cândida Guerreiro Mestre Palma	18	2			20	3	23	87,0%	13,0%	90,0%	10,0%	0,0%	0,0%
38	José Inácio Baptista Marques	28	5			33	5	38	86,8%	13,2%	84,8%	15,2%	0,0%	0,0%
74	Francisco Manuel Palma Martins	26				26	4	30	86,7%	13,3%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
11	Rodrigo Raimundo	6				6	1	7	85,7%	14,3%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
81	Dulce Vieira Paulino	26	7	1		34	6	40	85,0%	15,0%	76,5%	20,6%	2,9%	0,0%
26	Ana Rita Doreis Lobo	20	1	1		22	4	26	84,6%	15,4%	90,9%	4,5%	4,5%	0,0%
10	António Martins Luis	10	1			11	2	13	84,6%	15,4%	90,9%	9,1%	0,0%	0,0%
38	Manuel Carlos Mesa Marques	26	6			32	6	38	84,2%	15,8%	81,3%	18,8%	0,0%	0,0%
72	Maria Isabel Pires Cruz Sousa	31	2			33	7	40	82,5%	17,5%	93,9%	6,1%	0,0%	0,0%
89	Luis Miguel André do Rosário Dias	13	4	1		18	4	22	81,8%	18,2%	72,2%	22,2%	5,6%	0,0%
71	Duarte Manuel Cavaco Sequeira	23	1			24	6	30	80,0%	20,0%	95,8%	4,2%	0,0%	0,0%
73	José Assunção Pires	18	6			24	6	30	80,0%	20,0%	75,0%	25,0%	0,0%	0,0%
51	Manuel António Inácio	22	2			24	6	30	80,0%	20,0%	91,7%	8,3%	0,0%	0,0%
43	António Guerreiro Francisco	22	1			23	7	30	76,7%	23,3%	95,7%	4,3%	0,0%	0,0%
44	Bart Reze Soya Mese Marques	20	3			23	7	30	76,7%	23,3%	87,0%	13,0%	0,0%	0,0%
8	José Francisco Martins Bento	6				6	2	8	75,0%	25,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
138	Francisco Álvaro Colaço	38	2			40	14	54	74,1%	25,9%	95,0%	5,0%	0,0%	0,0%
25	José Manuel Tiago Luz	14	2	1		17	6	23	73,9%	26,1%	82,4%	11,8%	5,9%	0,0%
19	Luis Manuel Pereira Nobre	7	1			8	3	11	72,7%	27,3%	87,5%	12,5%	0,0%	0,0%
10	Manuel Alexandre Simões	8				8	3	11	72,7%	27,3%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
27	José Branco Colaço	16	3			19	8	27	70,4%	29,6%	84,2%	15,8%	0,0%	0,0%
52	José Manuel Martins Amaro	16	5			21	9	30	70,0%	30,0%	76,2%	23,8%	0,0%	0,0%
57	Lourenço e Borda D'água	21				21	9	30	70,0%	30,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
21	Gentil Manuel Guerreiro	13	1			14	7	21	66,7%	33,3%	92,9%	7,1%	0,0%	0,0%
14	Jose João Varela	9				9	5	14	64,3%	35,7%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
28	Diogo Sequeira Alves	12	2			14	8	22	63,6%	36,4%	85,7%	14,3%	0,0%	0,0%
46	Maria Adelina Gonçalves Madeira	19	3			22	13	35	62,9%	37,1%	86,4%	13,6%	0,0%	0,0%
8	Joaquim Manuel Palma Viseu	4	1			5	3	8	62,5%	37,5%	80,0%	20,0%	0,0%	0,0%
55	Rui Augusto PF Baltazar	21	3		1	25	15	40	62,5%	37,5%	84,0%	12,0%	0,0%	4,0%
38	Anibal Martins Guerreiro	11	2			13	8	21	61,9%	38,1%	84,6%	15,4%	0,0%	0,0%
5	Eduardo Rosa Nogueira	3				3	2	5	60,0%	40,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
5	João Pedro Gomes Alves	3				3	2	5	60,0%	40,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
98	Nuno Ricardo Silva P Fernandes	21	3			24	16	40	60,0%	40,0%	87,5%	12,5%	0,0%	0,0%
102	Rui Manuel Guerreiro Lança	15	2	1		18	12	30	60,0%	40,0%	83,3%	11,1%	5,6%	0,0%
61	Manuel Lourenço	12	2		3	17	13	30	56,7%	43,3%	70,6%	11,8%	0,0%	17,6%
48	Eduardo Rosa Ferreira	23	2	1		26	20	46	56,5%	43,5%	88,5%	7,7%	3,8%	0,0%
43	SA de Grupo Mt Novo da Condença	21	2			23	19	42	54,8%	45,2%	91,3%	8,7%	0,0%	0,0%
26	Joaquim Pereira Jorge	14				14	12	26	53,8%	46,2%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
28	Augusto Alexandre Duarte	13	2			15	13	28	53,6%	46,4%	86,7%	13,3%	0,0%	0,0%
43	Joaquim da Palma Simões	20	2			22	21	43	51,2%	48,8%	90,9%	9,1%	0,0%	0,0%
37	Duarte Nuno Salvador Simões	12				12	12	24	50,0%	50,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
12	Joaquim Maria Pereira	6				6	6	12	50,0%	50,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
6	José Francisco Luz	3				3	3	6	50,0%	50,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
55	Paulo Alexandre Paleta Duarte	10		1	1	12	13	25	48,0%	52,0%	83,3%	0,0%	8,3%	8,3%
33	Francisco António Cristina Calixto	10	1			11	14	25	44,0%	56,0%	90,9%	9,1%	0,0%	0,0%
47	João Diogo Simões	14	2			16	27	43	37,2%	62,8%	87,5%	12,5%	0,0%	0,0%
143	Eu sou, Prestação de Serviços	10				10	30	40	25,0%	75,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
42	Francisco Sequeira Alves	4	1			5	21	26	19,2%	80,8%	80,0%	20,0%	0,0%	0,0%
3	António João Guerreiro					0	3	3	0,0%	100,0%	-	-	-	-
	Somatório	626	85	10	6	717	148	865	82,9%	17,1%	87,3%	11,9%	1,4%	0,8%

Anexo 3. Análise estatística

Tabela 28. Teste de Kruskal Wallis para diferença de nº de animais por exploração entre a OPP de Vila do Conde, Acripinhal e Campo Branco.

	Nº de animais /exploração
Chi-Square	16,439
Df	2
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: OPP

Tabela 29. Teste de Kruskal Wallis para diferença de nº de amostras individuais recolhidas por exploração entre a OPP de Vila do Conde, Acripinhal e Campo Branco.

	Nº de amostras/exploração
Chi-Square	8,859
Df	2
Asymp. Sig.	,012

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: OPP

Tabela 30. Teste de Mann-Whitney U para diferença de percentagem de animais positivos por exploração entre a OPP de Vila do Conde e a OPP de Campo Branco.

Vila do Conde (VC) vs Campo Branco (CB)	% de animais positivos/ exploração
Mann-Whitney U	900,000
Wilcoxon W	2791,000
Z	-4,723
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000

a. Grouping Variable: OPP

Tabela 31. Teste de Mann-Whitney U para diferença de percentagem de animais positivos por exploração entre a OPP de Vila do Conde e a OPP de Acripinhal.

VC vs Acripinhal (A)	% de animais positivos/ exploração
Mann-Whitney U	20,000
Wilcoxon W	1911,000
Z	-2,271
Asymp. Sig. (2-tailed)	,023
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,017a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: OPP

Tabela 32. Teste de Mann-Whitney U para diferença de percentagem de animais positivos por exploração entre a OPP de Acripinhal e a OPP de Campo Branco.

A vs CB	% de animais positivos/ exploração
Mann-Whitney U	51,000
Wilcoxon W	1821,000
Z	-1,231
Asymp. Sig. (2-tailed)	,218
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,237a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: OPP

Tabela 33. Teste de Mann-Whitney U para diferença de percentagem de animais positivos grau 1 por exploração, entre a OPP de Vila do Conde e a OPP de Acripinhal.

VC vs A	Per_ 1
Mann-Whitney U	38,000
Wilcoxon W	44,000
Z	-1,709
Asymp. Sig. (2-tailed)	,087
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,095a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: OPP

Tabela 34. Teste de Mann-Whitney U para diferença de percentagem de animais positivos grau 1 por exploração, entre a OPP de Vila do Conde e a OPP de Campo Branco.

Vc vs CB	Per_ 1
Mann-Whitney U	1762,000
Wilcoxon W	3532,000
Z	-,198
Asymp. Sig. (2-tailed)	,843

a. Grouping Variable: OPP

Tabela 35. Teste de Mann-Whitney U para diferença de percentagem de animais positivos grau 1 por exploração, entre a OPP de Acripinhal e a OPP de Campo Branco.

A vs CB	Per_ 1
Mann-Whitney U	35,000
Wilcoxon W	41,000
Z	-1,768
Asymp. Sig. (2-tailed)	,077
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,084a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: OPP

Tabela 36. Teste de Mann-Whitney U para diferença de percentagem de animais positivos grau 2 por exploração, entre a OPP de Vila do Conde e a OPP de Acripinhal.

VC vs A	Per_ 2
Mann-Whitney U	34,500
Wilcoxon W	1925,500
Z	-1,831
Asymp. Sig. (2-tailed)	,067
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,070a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: OPP

Tabela 37. Teste de Mann-Whitney U para diferença de percentagem de animais positivos grau 2 por exploração, entre a OPP de Vila do Conde e a OPP de Campo Branco.

VC Vs CB	Per_ 2
Mann-Whitney U	1703,500
Wilcoxon W	3594,500
Z	-,510
Asymp. Sig. (2-tailed)	,610

a. Grouping Variable: OPP

Tabela 38. Teste de Mann-Whitney U para diferença de percentagem de animais positivos grau 2 por exploração, entre a OPP de Acripinhal e a OPP de Campo Branco.

A vs CB	Per_ 2
Mann-Whitney U	30,000
Wilcoxon W	1800,000
Z	-1,939
Asymp. Sig. (2-tailed)	,052
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,055a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: OPP

Tabela 39. Teste de Mann-Whitney U para diferença de percentagem de animais positivos grau 3 por exploração, entre a OPP de Vila do Conde e a OPP de Acripinhal.

VC vs A	Per_3
Mann-Whitney U	42,500
Wilcoxon W	1933,500
Z	-2,286
Asymp. Sig. (2-tailed)	,022
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,125a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: OPP

Tabela 40. Teste de Mann-Whitney U para diferença de percentagem de animais positivos grau 3 por exploração, entre a OPP de Vila do Conde e a OPP de Campo Branco.

Vc Vs CB	Per_3
Mann-Whitney U	1767,000
Wilcoxon W	3537,000
Z	-,268
Asymp. Sig. (2-tailed)	,788

a. Grouping Variable: OPP

Tabela 41. Teste de Mann-Whitney U para diferença de percentagem de animais positivos grau 3 por exploração, entre a OPP de Acripinhal e a OPP de Campo Branco.

A Vs CB	Per_3
Mann-Whitney U	36,000
Wilcoxon W	1806,000
Z	-2,586
Asymp. Sig. (2-tailed)	,010
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,090a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: OPP

Tabela 42. Teste de Mann-Whitney U para diferença de percentagem de animais positivos grau 4 por exploração, entre a OPP de Vila do Conde e a OPP de Acripinhal.

VC vs A	Per_4
Mann-Whitney U	64,000
Wilcoxon W	1955,000
Z	-2,385
Asymp. Sig. (2-tailed)	,017
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,409a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: OPP

Tabela 43. Teste de Mann-Whitney U para diferença de percentagem de animais positivos grau 4 por exploração, entre a OPP de Vila do Conde e a OPP de Campo Branco.

VC vs CB	Per_4
Mann-Whitney U	1705,000
Wilcoxon W	3596,000
Z	-1,221
Asymp. Sig. (2-tailed)	,222

a. Grouping Variable: OPP

Tabela 44. Teste de Mann-Whitney U para diferença de percentagem de animais positivos grau 4 por exploração, entre a OPP de Acipinhal e a OPP de Campo Branco.

A vs CB	Per_4
Mann-Whitney U	67,000
Wilcoxon W	1837,000
Z	-1,375
Asymp. Sig. (2-tailed)	,169
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,511a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: OPP

Tabela 45. Teste exacto de Fisher para comparação entre reposição de animais nas explorações, entre as OPP de Vila do Conde, Acipinhal e OPP de Campo Branco.

Chi-Square Tests						
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	1,458 ^a	1	,227	,255	,182	
Continuity Correction ^b	,832	1	,362			
Likelihood Ratio	1,501	1	,221	,255	,182	
Fisher's Exact Test				,255	,182	
Linear-by-Linear Association	1,445 ^c	1	,229	,255	,182	,117
N of Valid Cases	114					
a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6,04.						
b. Computed only for a 2x2 table						
c. The standardized statistic is 1,202.						

Tabela 46. Teste de Wilcoxon Signed Ranks para comparação dos graus de positividade no dia 1 e no dia 30 do estudo de caso 1.

Test Statistics^b

	Result_dia30 - Result_dia1
Z	-,042 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,966

a. Based on negative ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 47. Teste exacto de Qui-quadrado de Pearson para comparação das proporções de positivos à microbiologia nos diferentes graus de positividade à sorologia no estudo de caso 1.

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	49,234 ^a	4	,000	,000		
Likelihood Ratio	38,431	4	,000	,000		
Fisher's Exact Test	35,999			,000		
Linear-by-Linear Association	34,942 ^b	1	,000	,000	,000	,000
N of Valid Cases	270					

a. 2 cells (20,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,73.

b. The standardized statistic is 5,911.